

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2004 年 11 月 11 日 (11.11.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/097015 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/00, C12Q 1/68,  
A01H 1/00, A01K 67/00, A61D 19/00

特願2004-093824 2004 年 3 月 26 日 (26.03.2004) JP  
特願2004-093825 2004 年 3 月 26 日 (26.03.2004) JP

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/006284

(22) 国際出願日: 2004 年 4 月 30 日 (30.04.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2003-126667 2003 年 5 月 1 日 (01.05.2003) JP  
特願2004-093826 2004 年 3 月 26 日 (26.03.2004) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒3320012 埼玉県川口市本町四丁目 1 番 8 号 Saitama (JP).

(72) 発明者; および

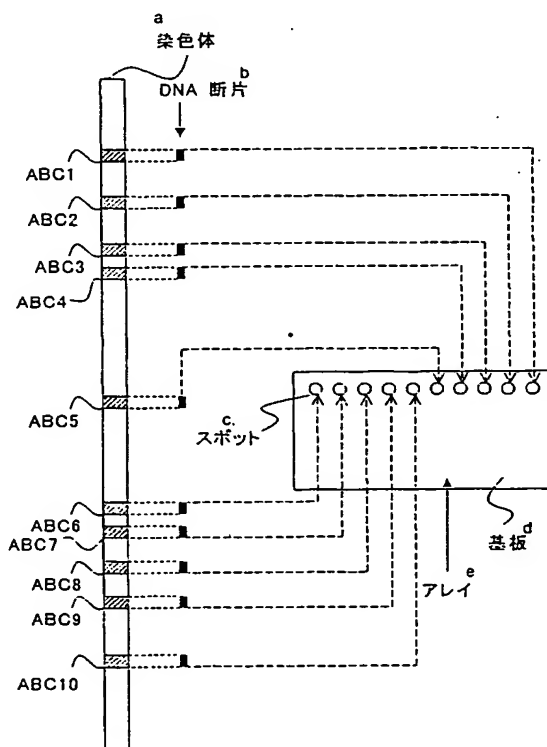
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 武田 和義 (TAKEDA, Kazuyoshi). 佐藤 和広 (SATO, Kazuhiro).

(74) 代理人: 原 謙三 (HARA, Kenzo); 〒5300041 大阪府大阪市北区天神橋 2 丁目北 2 番 6 号 大和南森町ビル 原謙三国際特許事務所 Osaka (JP).

[続葉有]

(54) Title: ARRAY HAVING SUBSTANCES FIXED ON SUPPORT ARRANGED WITH CHROMOSOMAL ORDER OR SEQUENCE POSITION INFORMATION ADDED THERETO, PROCESS FOR PRODUCING THE SAME, ANALYTICAL SYSTEM USING THE ARRAY AND USE OF THESE

(54) 発明の名称: 支持体上に固定化した物質を染色体の順あるいは配列位置情報を付加して配列するアレイおよびその製造方法、アレイを用いた解析システム、並びにそれらの利用



a...CHROMOSOME  
b...DNA FRAGMENT  
c...SPOT  
d...SUBSTRATE  
e...ARRAY

(57) Abstract: In the production of various arrays such as a microarray, multiple types of biosubstances obtained from an arbitrary living organism, or synthetic substances capable of interacting with such biosubstances are arranged and immobilized on a support in such an orderly manner that the order of respective base sequence blocks corresponding to the biosubstances lined up on the chromosome can be ascertained. As the biosubstances, there can be mentioned nucleic acids such as DNA, polypeptides such as protein, etc. As the above synthetic substances, there can be mentioned compounds capable of reacting with them. By virtue of this regulation of the sequence order of biosubstances or synthetic substances immobilized on a support, the array can be of avail in, for example, screening conducted at creature breed improvement.

(57) 要約: マイクロアレイ等の各種アレイを製造する際に、任意の生物から得られた複数種類の生体物質、または、生体物質と相互作用する合成物質を、各生体物質に対応するそれぞれの塩基配列のブロックが染色体上に並んでいる順序が確認できるように、支持体上に規則的に配列させて固定化させる。上記生体物質としては、DNA等の核酸、タンパク質等のポリペプチド等を挙げることができ、上記合成物質としては、これらと反応する化合物を挙げることができる。このように、支持体上に固定化される生体物質や合成物質の配列の順序を規定することで、例えば、生物の品種改良時の選抜等に用いることが可能となる。

WO 2004/097015 A1



(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY,

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明 細 書

支持体上に固定化した物質を染色体の順あるいは配列位置情報を付加して配列するアレイおよびその製造方法、アレイを用いた解析システム、並びにそれらの利用

## 5 技術分野

本発明は、例えば、新規なアレイおよびその製造方法と、アレイを用いた各種解析システムと、これら技術の代表的な利用方法とに関するものである。

より具体的には、（１）DNAマイクロアレイ等のように、生物由来の生体物質や生体物質と相互作用する合成物質を、支持体上に規則的に配列させて固定化してなるアレイ、（２）任意の生物の遺伝子型を表示可能に解析するシステム、特に、交雑に由来する雑種個体において、染色体上のどの位置で交叉が生じているかを視覚的に確認可能とする遺伝子型解析表示システム、（３）任意の生物の量的遺伝子座（QTL）を解析するシステムとその代表的な利用方法、特に、核酸アレイを用いて得られる分析結果を有効に利用して、QTLを解析する量的遺伝子座解析システム、並びに、（４）遺伝子相互作用解析システム、特に、核酸アレイを用いて得られる分析結果を有効に利用して、解析対象となる形質や遺伝子にどのような遺伝子（群）が関与しているか否かを有効に解析する遺伝子相互作用解析システムと、これらアレイや解析システムの代表的な利用方法とに関するものである。

20

## 背景技術

近年、世界的なゲノムプロジェクトの進展により、多数のモデル生物の全ゲノム配列がすでに決定されており、また、ヒトゲノム・プロジェクトによるヒトゲノム配列の解読のように、全ゲノム配列が決定されつつあるものも多い。このように分子生物学の研究は、ポストゲノム（ポストシーケンス）の時代に移行しつつある。

25

ポストゲノム時代では、ゲノム機能の解析の手法も変化し始めている。具体的

には、ゲノム機能解析の主流は、以前のような、特定の生命現象に關与する個々の遺伝子をクローニングして解析するようなピンポイント的手法から、遺伝子の機能をゲノムスケールで解析する体系的・網羅的手法へと、明らかに移行している。

5       また、ゲノム情報は、転写産物やタンパク質の解析にも用いられる。具体的には、転写産物の解析としては、ゲノム情報を利用して、生物や細胞における全ての転写産物の発現を体系的・網羅的に解析するトランスクリプトーム解析が注目されており、タンパク質の解析としては、ゲノム情報を利用して、生物や細胞における全ての場所・時系列で発現している全てのタンパク質について、その性質  
10       や発現を体系的・網羅的に解析するプロテオーム解析が注目されている。

      上記体系的・網羅的な解析には、各種アレイ技術が用いられることが多い。このアレイ技術は、解析しようとする任意の生物から取得したDNAや各種タンパク質等の生体物質、あるいは、このような生体物質と相互作用する合成物質（例えば、疎水性基やイオン交換基を有する化合物等）を、支持体上に規則的に配列  
15       させて固定化してなるアレイを用いる技術を指す。

      このようなアレイ技術を用いれば、体系的・網羅的な解析を効率的に進めることができる。例えば、遺伝子の転写制御機構を解析するためには、細胞の状態に応じて変化する遺伝子の転写量を測定する必要がある。そこで、アレイ技術の一つであるDNAマイクロアレイを用いることにより、数千個から数万個の遺伝子の  
20       転写量をシステムティックに測定することが可能となる（例えば、非特許文献1～6参照）。

      また、上記DNAマイクロアレイに関する技術のうち、広く実用化されているものとしては、米国Affymetrix社のDNAマイクロアレイ技術が知られている。この技術では、半導体製造で用いられる微細加工技術を用いてシリカ基板上に直接オリゴヌクレオチドを化学合成するようになっている（例えば、特許文献1参  
25       照）。

      ところで、例えば、遺伝子の転写制御機構を解析するためには、細胞の状態に応じて変化する遺伝子の転写量を測定する必要がある。そこで、アレイの一種であるDNAマイクロアレイを用いることにより、数千個から数万個の遺伝子の転



写量をシステマティックに測定することが可能となる。このようにDNAマイクロアレイ等のような核酸アレイは、ハイブリダイゼーションにより大量の遺伝子発現データを得ることができる。

しかしながら、核酸アレイから得られる遺伝子発現データのように、バイオテクノロジーで得られるデータは量的に膨大なものとなるため、手作業で処理することは不可能である。そこで、近年では、コンピュータを利用してこれら大量のデータを解析するバイオインフォマティクス技術が種々提案されている。このような技術のうち、遺伝子発現データを解析するための技術としては、例えば、特許文献2に開示されている、クラスター化により遺伝子発現パターンを解析する技術や、特許文献3に開示されているような、遺伝子発現データをパラメータに基づいて解析し臨床利用する技術等が知られている。

また、解析対象となるデータ量が多ければ解析結果も複雑なものとなり得る。そのため、バイオインフォマティクス技術では、解析した結果を良好に表示する技術も要求されることになる。例えば、遺伝子発現の表示に関する技術としては、特許文献4に開示されているような、発現レベルを二次元化し表示する技術等が知られている。

ところで、近年の遺伝子組換え技術の進歩により、各種の植物に対して外来の遺伝子を導入することにより新たな形質を付与することがなされ、そのような植物を農作物として実用化することにもなされている。このような遺伝子組み換え作物（GMO）の開発は、有望なバイオ産業になり得ると考えられていたが、消費者レベルではGMOを受け入れる体制にはなっておらず、最近ではGMOを利用しないことで加工食品の安全性を強調するような状況となりつつある。

したがって、農作物の品種改良では、伝統的な交雑育種や変異作出が廃れることはほとんど考えられず、逆に、農作物やそれを用いた加工食品の商品力を高めるためには、農作物の品種改良では交雑育種等を主として用いる方が好ましいと考えられる。

しかしながら、例えば、交雑育種による品種改良では、得られる雑種の性質を観察したり形質を分析したりすることで、実際に何千～何万栽培した雑種個体の中から実用性のある個体を選抜することになる。それゆえ優良個体の選抜効率は

非常に低いものとなっている。

そこで、アレイ技術およびバイオインフォマティクス技術を利用すれば、伝統的な交雑育種による品種改良をより効率良く進めることが可能になると考えられる。

- 5       また、上記交雑育種においては遺伝マーカーを用いる遺伝子型の選抜技術が知られている。ここで、遺伝マーカーを利用した育種では、対象となる量的形質に関与している遺伝子座（QTL）を確認することが重要となる。量的形質はポリジーン系に支配されているため、個々の遺伝子の発現効果を直接取り扱うことは不可能である。それゆえ、QTLを確認するためには、統計学的な解析が重要となる。具体的には、全ゲノム上に分散するように遺伝マーカーを選定し、当該遺  
10       伝マーカーと量的形質との連鎖を調べ、連鎖地図上にQTLの位置をマッピングすることにより、QTLを確認する。

- QTL解析においては、遺伝マーカーの開発や、連鎖地図作成のための集団系  
      統（家系）の構築といった素材の開発だけでなく、形質値の測定や、遺伝マ  
15       ーカーのタイピング（遺伝マーカー数×個体数）等のように、解析に関する情報量も膨大となる。そのため、アレイ技術およびバイオインフォマティクス技術を利用すれば、QTL解析を効率良く進めることが可能になると考えられる。

- ところで、遺伝子発現データの解析のうち、発現プロファイルは、細胞の種類  
      や時期によって異なる遺伝子の種類や量のパターンのことを言う。この発現プロ  
20       ファイルを測定し解析することにより遺伝子機能や調節機構に関する重要な知見を得ることができる。そのため、産業上有用な生物種の品種改良（育種）に有効に利用できるだけでなく、ヒトの場合には、創薬、薬理学、毒性学、診断に供する知見も得ることが可能となる。

- 上記発現プロファイル解析の技術としては、例えば、上記特許文献2や特許文  
25       献5に開示されているように、クラスター化による解析技術が知られている。このクラスター化とは、核酸アレイ上の遺伝子が、異なる測定状況にわたって類似した発現パターンを示す遺伝子群を同定し、クラスターとして分類することを指す。また、他の技術としては、特許文献6に示すように、遺伝子間の発現のネットワークを解析する技術も知られている。一つの遺伝子の発現レベルは、直接的

または間接的に他の遺伝子に調節されているため、このような遺伝子間の発現のネットワークは、上記クラスター化とともに、発現プロファイル解析では重要な情報となる。

また、ヒトへの応用の点から、特許文献7には、各被検試料から得られるデータから注目する評価指標を定量的に推定するための適切な遺伝子を選択し、評価指標を推定する技術が開示されている。すなわち、ヒトの疾病に伴う遺伝子発現プロファイルの変化を計測する場合、被検試料を多量に集めることが困難であるため、発現量の変化を計測する遺伝子の数と比較して、被検試料の数が非常に少ない。そのため、通常の統計的な手法では疾病との相関解析が困難である場合が多い。このような状況に対応すべく、特許文献7では、注目する評価指標と関係の深い遺伝子を抽出し、評価指標データを推定している。

〔非特許文献1〕

「ゲノム機能 発現プロファイルとトランスクリプトーム」 監修：松原謙一・榊佳之、中山書店、2000年9月13日発行

〔非特許文献2〕

「DNAマイクロアレイ」 監訳：加藤郁之進、丸善、2000年9月25日発行

〔非特許文献3〕

「必ずデータが出る DNAマイクロアレイ実戦マニュアル 基本原理、チップ作成技術からバイオインフォマティクスまで」 監修：林崎良英、羊土社、2000年12月1日発行

〔非特許文献4〕

「わかる！使える！DNAマイクロアレイデータ解析入門」 Steen Knudsen、羊土社、2002年11月20日発行

〔非特許文献5〕

"DNA Microarrays" Associate Editor: Kaaren Janssen, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003

〔非特許文献6〕

"Microarray analysis" Mark Schena, John Wiley & Sons, Inc., 2003

〔特許文献1〕

特開2000-228999公報（公開日：平成12（2000）年8月22日）

〔特許文献2〕

5 特開2000-342299（平成12（2000）年12月12日公開）

〔特許文献3〕

特表2003-508853（平成15（2003）年3月4日公開、国際公開番号：WO01/016860、平成13（2001）年3月8日国際公開）

〔特許文献4〕

10 特開平11-342000（平成11（1999）年12月14日公開）

〔特許文献5〕

特開2004-30093（平成16（2004）年1月29日公開）

〔特許文献6〕

特開2002-175305（平成14（2002）年6月21日公開）

15 〔特許文献7〕

特開2003-4739（平成15（2003）年1月8日公開）

ここで、上記従来のアレイ技術は、ゲノム解析を中心とする学術的な用途、研究ツールとしての用途が優先して技術開発がなされていたため、より実用的な用途についての技術開発はあまりなされていない。それゆえ、個体識別や遺伝解析等、より実用的な用途には不適となる場合もありうるという課題を有している。

20 すなわち、上記アレイ技術においては、支持体の上に固定化されている生体物質や合成物質は、規則的に配列されているものの、その配列の順序には、特に決まりがあるわけではなく、ほとんどの場合ランダムに配列されている。アレイ技術は、遺伝子等の体系的・網羅的な解析を基本的な用途としているため、生体物質や合成物質の配列の順序はランダムであっても何ら問題はなく、逆に、何らかの基準に基づいて、所定の順序で配列することには特に意義がなかった。

25 しかしながら、遺伝子等の体系的・網羅的な解析は、例えば、植物等の品種改良等のように、より実用的な用途に利用できる可能性がある。このような用途に用いられるアレイ技術では、上記生体物質や合成物質を染色体上の位置情報を付

加して解析することが望ましく、またその配列の順序も、何らかの基準に基づいた順序とすることが要求される場合もありうる。

また、上記従来のバイオインフォマティクス技術では、交雑育種による品種改良、QTL解析等をより効率良く進めるという用途には有効に用いることができないという課題を有している。

具体的には、交雑育種では、上述したように、膨大に得られる雑種世代から目的の形質を発現する個体を選抜する必要がある。これまでは、雑種世代を形質が確認できるまで数年間生育させる必要があるとともに、形質の種類によっては、単に生育させるだけでは容易に判定できないものも存在する。そこで、核酸アレイを用いて得られる大量の遺伝子発現データを上記選抜に利用すれば、雑種世代の各個体から核酸を取得するだけで、目的の形質が遺伝されているか否かを、効率的かつ高い再現性で確認することが可能となる。

しかしながら、遺伝子発現に関する上記従来のバイオインフォマティクス技術は、このような目的で開発されたものではないため、DNAマイクロアレイから得られる遺伝子発現データを交雑育種に有効利用することはできなかった。

また、QTL解析では、統計学的な解析が行われるため、それ自体はバイオインフォマティクス技術を適用しやすい分野となっている。しかしながら、アレイ技術をバイオインフォマティクス技術と組み合わせてQTL解析に応用する技術はほとんど知られておらず、また、遺伝子発現に関する上記従来のバイオインフォマティクス技術もQTL解析に有効利用することはできなかった。

さらに、上記従来の技術では、任意の種類や任意の時期の細胞について発現プロファイル解析を行うことにより、遺伝子機能や調節機能に関する知見を得ることができるが、特定の形質に関与する遺伝子の発現については、十分な知見を得ることができないという課題を有している。

すなわち、上述した発現プロファイル解析技術では、特定の種類の細胞や特定の時期の細胞について発現プロファイル解析を行っているため、網羅的な遺伝子発現の解析が可能になり、種類や時期に特異的な発現パターンを得ることが可能である。ところが、このような技術は、ターゲットとなる遺伝子または遺伝子群を見出すことには有用であるが、任意の形質や遺伝子を最初から特定しておき、

当該形質や遺伝子に対してどのような遺伝子（群）が関与しているのかを解析するには、不十分となる。

すなわち、網羅的な遺伝子発現の解析では、膨大な発現情報から、クラスター化やネットワークを見出し、そこからさらに特定の遺伝子または遺伝子群を見出すことには有用である。しかしながら、特定の形質や遺伝子を中心として、当該形質や遺伝子にどのような遺伝子（群）が関与しているのかを分析する場合、膨大な発現情報から所望の情報を絞り込む手法では、無駄な情報処理を生ずることになるだけでなく、絞り込みのポイントが曖昧になる可能性があり、有効な解析は困難となる。

#### 発明の開示

本発明は、上記課題に鑑みなされたものであり、その目的は、支持体上に固定化される生体物質や合成物質の配列の順序を規定することで、例えば、生物の品種改良時の選抜等に用いることが可能なアレイ技術を提供することにある。

また、本発明の他の目的は、核酸アレイを用いて得られる遺伝子発現データを交雑育種による品種改良に有効に利用するために好適に用いられる遺伝子型解析表示システム、核酸アレイを用いて得られるデータをQTL解析に有効に利用するために好適に用いられる量的遺伝子座解析システム、核酸アレイから得られる分析結果を用いて、解析対象となる形質や遺伝子を先に指定し、これら形質や遺伝子にどのような遺伝子（群）が関与しているか否かを有効に解析する遺伝子相互作用解析システムと、これら解析システムの代表的な利用方法とを提供することにある。

本発明者らは、上記の課題に鑑みて鋭意検討した結果、例えば、DNAマイクロアレイであれば、ガラス基板（支持体）上に固定化するDNA断片を、染色体上にコードされている順序で配列するか、あるいはその順序の情報を付加して解析することにより、生物の品種改良時の選抜等に利用することが可能であることを見出し、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明にかかるアレイは、上記の課題を解決するために、任意の生物から得られた複数種類の生体物質、または、生体物質と相互作用する合成物質

を、支持体上に規則的に配列させて固定化してなるアレイにおいて、上記複数種類の生体物質または合成物質は、各生体物質に対応するそれぞれの塩基配列のブロックが染色体上に並んでいる順序が確認可能に配列されている。

上記アレイにおいて、上記染色体上に並んでいる順序が確認可能に配列されている具体的な例としては、これら複数種類の生体物質または合成物質の配列の順序が、各生体物質に対応するそれぞれの塩基配列のブロックが染色体上に並んでいる順序となっている場合を挙げることができる。なお、この例を、直接配列型と称する（実施の形態 1 参照）。

上記直接配列型のアレイにおいては、上記複数種類の生体物質または合成物質の配列の全てについて各生体物質に対応するそれぞれの塩基配列のブロックが染色体上に並んでいる順序となっている必要はなく、その配列の少なくとも一部に、各生体物質に対応するそれぞれの塩基配列のブロックが染色体上に並んでいる順序で配列されている個所が含まれていればよい。また、上記支持体上には、各生体物質に対応するそれぞれの塩基配列のブロックが染色体上に並んでいる順序を指示する標識が設けられていてもよい。

また、上記染色体上に並んでいる順序が確認可能に配列されている他の例としては、固定化されている生体物質または合成物質それぞれについて、各生体物質に対応するそれぞれの塩基配列のブロックが染色体上に並んでいる順序に対応する配列位置情報が付与されており、使用時には、データの取得とともに、これら配列位置情報を読み取って、上記データの配列の順序を染色体上に並んでいる順序に並べ変え可能となっている場合を挙げることができる。なお、この例を、間接配列型と称する（実施の形態 1 参照）。

上記間接配列型のより具体的な例としては、例えば、上記支持体が、個々の生体物質または合成物質を固定化する小支持体の集団からなっていると同時に、各小支持体には、各生体物質に対応するそれぞれの塩基配列のブロックが染色体上に並んでいる順序に対応する配列位置情報が付与されており、この配列位置情報に基づいて、取得したデータの配列の順序を、染色体上に並んでいる順序に並べ変える構成を挙げることができる。

上記アレイにおいては、生体物質として、核酸またはポリペプチドを用いるこ

とができ、上記核酸としては、例えば、DNAが用いられる。このDNAとしては特に限定されるものではないが、例えば、遺伝マーカー、ゲノムDNA、制限酵素処理したゲノムDNA、cDNA、EST、または合成オリゴDNA等を用いることができる。さらに、上記支持体上に固定化される複数のDNAは遺伝地図または物理地図を基準として配列されていることが好ましい。

通常、遺伝子の発現量を定量する場合には、ターゲットのサンプルとしてmRNA由来のcDNAまたはcRNAを用いることが一般的である。本発明では、これに加えて、上記アレイにおいて、生体物質として核酸を用いた場合には、ターゲットDNAとして、制限酵素処理されたゲノミックDNAを用いることができる。このとき、上記ターゲットDNAは、制限酵素処理された後にサイズ分画されていることが好ましい。

また、上記生体物質としてポリペプチドが用いられる場合には、当該ポリペプチドとして、タンパク質またはその断片、あるいはオリゴペプチドを用いることができる。上記のうち、タンパク質としては特に限定されるものではないが、例えば、酵素、キナーゼ、抗体、受容体、またはSH3領域を有するタンパク質を用いることができる。さらに、上記支持体上に固定化される複数のタンパク質は遺伝地図または物理地図を基準として配列されていることが好ましい（実施の形態2参照）。

本発明にかかるアレイにおいては、上記支持体または小支持体として、無機系材料からなる基板、有機系材料からなる膜、または、ビーズを用いることができる。本発明にかかるアレイのより具体的な例としては、マイクロアレイ、マクロアレイ、ビーズアレイまたはプロテインチップの何れかを挙げることができる。

また、本発明にかかるアレイの製造方法は、任意の生物から得られた複数種類の生体物質、または、生体物質と相互作用する合成物質を、支持体上に規則的に配列させて固定化する工程とを含んでおり、上記工程では、固定化される上記生体物質または合成物質を、生体物質に対応する遺伝子を基準として、当該遺伝子が上記生物の染色体にコードされている順序にしたがって配列させることを特徴としている。この製造方法においては、上記生体物質として、核酸またはポリペプチドを用いることができる。



本発明の利用方法としては特に限定されるものではないが、例えば、生体物質としてDNAを用いたアレイを用いて、生物を交雑して得られる雑種から目的の形質を含む染色体断片を同定する遺伝子型の同定方法を挙げることができる。このとき染色体断片を同定しようとする上記生物としては特に限定されるものではないが、例えば、実験用の動植物（実験動物・実験植物）等を挙げることができる。さらに、染色体断片を同定しようとする上記生物はヒトであってもよく、この場合には、上記遺伝子型の同定方法を用いた遺伝子診断方法とすることができる。

本発明の他の利用方法としては、例えば、生体物質としてDNAを用いたアレイを用いて、品種改良しようとする生物を交雑して得られる雑種から目的の形質を保持する品種を選抜する品種改良における選抜方法を挙げることができる。このとき品種改良しようとする生物としては特に限定されるものではないが、例えば、家畜動物または農作物を挙げることができ、上記農作物としては、具体的には、イネ、コムギ、トウモロコシまたはオオムギ等のイネ科植物を挙げることができる。

また、本発明者は、上記課題に鑑み鋭意検討した結果、核酸アレイを用いて得られる雑種個体の遺伝子発現データを解析する際に、少なくとも、当該雑種個体の両親の遺伝情報、および、これら個体の属する生物種の遺伝地図を利用すれば、染色体上のどの位置で交叉が生じているかを視覚的に確認できるように上記遺伝子発現データを解析でき、その結果、核酸アレイを用いて得られる遺伝子発現データを交雑育種による品種改良に有効に利用することが可能であることを見出し、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明にかかる遺伝子型解析表示システムは、交雑により得られる雑種個体を核酸アレイによりハイブリダイズ分析することで得られる、当該雑種個体の網羅的な遺伝子の発現量情報を、当該雑種個体の両親の遺伝情報、および、これら個体の属する生物種の遺伝地図と比較し、任意の雑種個体の遺伝子型が何れの両親に由来するかを判別する遺伝子型由来判別部と、遺伝子型由来判別部から得られる判別結果を複数まとめ、これら判別結果に基づいて、個々の遺伝子型が何れの両親に由来するかを識別可能とするように、染色体ごとに複数の遺伝

子型をまとめて表示するための表示用情報を生成する表示用情報生成部とを備えている（実施の形態4参照）。

上記遺伝子型解析表示システムにおいては、上記核酸アレイとして、当該核酸アレイに固定されている複数の核酸分子が、当該核酸分子に対応するそれぞれの塩基配列のブロックが染色体上に並んでいる順序が確認可能に配列されている染色体座位確認可能アレイが用いられることが非常に好ましい。

さらに、上記遺伝子型解析表示システムにおいては、遺伝地図作成情報に基づき、上記雑種個体の属する生物種の遺伝地図を作成する遺伝地図作成部を備えることが好ましい。このとき、上記遺伝地図作成情報として、少なくとも、当該生物種で知られている遺伝子および／または遺伝マーカーの名称と、当該遺伝子および／またはマーカーの染色体上の座乗位置とが用いられることが好ましい。

上記遺伝子型解析表示システムにおいては、上記遺伝子型由来判別部は、任意の遺伝子型を、何れかの両親型、ヘテロ型、または判別不能の何れかに判別し、これを判別結果として生成することが好ましい。また、上記遺伝子型由来判別部は、両親の遺伝情報として、両親の遺伝子型情報および／または遺伝子発現プロファイル情報を用いることが好ましい。

上記遺伝子型解析表示システムにおいては、上記表示用情報生成部は、さらに、染色体別の組換え数、および組換え頻度の少なくとも一方を表示用情報に含めて生成するが好ましい。また、上記表示用情報生成部は、表示色または表示パターンを変えることにより任意の遺伝子型の由来を識別可能に表示するよう表示用情報を生成するが好ましい。

上記遺伝子型解析表示システムにおいては、さらに、入力部および出力部の少なくとも一方を備えることが好ましい。このとき、上記入力部は、上記雑種個体の網羅的な遺伝子の発現量情報、および、両親の遺伝情報の少なくとも何れかを入力可能とするものであればよく、さらには、遺伝地図作成情報を入力可能とすることが好ましい。

上記入力部としては、例えば、核酸アレイを用いたハイブリダイゼーションの結果を画像情報として読み取ることができるスキャナが備えられている構成を挙げることができる。このとき、得られた画像情報から遺伝子の発現量を解析

し、網羅的な遺伝子の発現量情報を生成する画像情報処理部も備えられていることが好ましい。

また、上記入力部としては、上記雑種個体の網羅的な遺伝子の発現量情報、両親の遺伝情報、および遺伝地図作成情報の少なくとも何れかを修正可能とする手  
5 動入力部を備えていることが好ましい。

一方、上記出力部としては、表示用情報を画面上で表示するディスプレイ、および、表示用情報を印刷するプリンタの少なくとも何れかを備えていることが好ましい。さらに、上記入力部および出力部として、外部の装置との間で情報の入出力を可能とする外部通信部を備えていることが好ましい。

10 上記遺伝子型解析表示システムにおいては、上記核酸アレイとして、一般的には、固定化される核酸がDNAであるDNAアレイが用いられるが、もちろんこれに限定されるものではない。上記DNAアレイに固定化されるDNAとしては、具体的には、例えば、遺伝マーカー、ゲノムDNA、制限酵素処理したゲノムDNA、cDNA、EST、または合成オリゴDNAを挙げることができる。また、  
15 上記核酸アレイとしては、具体的には、例えば、マイクロアレイ、マクロアレイ、またはビーズアレイを挙げることができる。

本発明の利用方法は特に限定されるものではないが、例えば、上記遺伝子型解析表示システムを用いて、生物を交雑して得られる雑種から目的の形質を含む染色体断片を同定する遺伝子型の同定方法を挙げることができる。このとき用い  
20 られる生物は、実験用に用いられる動植物を好ましく挙げることができる。

本発明の他の利用方法としては、例えば、上記遺伝子型解析表示システムを用いて、品種改良しようとする生物を交雑して得られる雑種から目的の形質を保持する品種を選抜する品種改良における選抜方法を挙げることができる。このとき  
25 上記品種改良しようとする生物は、実験用の動植物、家畜動物または農作物を挙げることができる。

さらに、本発明者は、上記課題に鑑み鋭意検討した結果、核酸アレイにおける個々のスポットのハイブリダイゼーション結果を遺伝マーカー情報として用いることにより、核酸アレイを用いて得られる遺伝子発現データをQTL解析に有効に利用することが可能であることを見出し、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明にかかる量的遺伝子座解析システムは、任意の生物種の遺伝マーカーを固定化した核酸アレイに対して、集団系統ごとに得られる雑種個体から得られるゲノム試料をハイブリダイズさせることで得られる、雑種個体の網羅的な遺伝子の存在情報を、当該雑種個体の属する生物種の遺伝子地図、および、  
5 当該生物種で明らかとなっている遺伝マーカー情報と照合し、集団系統ごとに存在する遺伝マーカーを特定する遺伝マーカー特定部と、同一の雑種個体における任意の表現型を数値化した表現型値が、上記遺伝マーカーと連鎖しているか否かを確認することにより、当該表現型の量的遺伝子座を決定する量的遺伝子座決定部とを備えている（実施の形態5参照）。

10 上記量的遺伝子座解析システムにおいては、上記核酸アレイとして、当該核酸アレイに固定されている複数の核酸分子が、当該核酸分子に対応するそれぞれの塩基配列のブロックが染色体上に並んでいる順序が確認可能に配列されている染色体座位確認可能アレイが用いられることが非常に好ましい。

さらに、上記量的遺伝子座解析システムにおいては、上記遺伝地図作成情報に基づき、上記雑種個体の属する生物種の遺伝地図を作成する遺伝地図作成部を備えることが好ましい。このとき、上記遺伝地図作成情報として、少なくとも、当該生物種で知られている遺伝子および／または遺伝マーカーの名称と、当該遺伝子および／またはマーカーの染色体上の座乗位置とが用いられることが好ましい。  
15

20 上記量的遺伝子座解析システムにおいては、上記遺伝マーカー特定部で用いられる遺伝マーカー情報は、多型を有する遺伝マーカーであることが好ましく、より具体的には、上記遺伝マーカーがSNPまたはRFLPであることが好ましい。

また、上記量的遺伝子座解析システムにおいては、上記量的遺伝子座決定部では、インターバルマッピングを行うことにより、上記表現型の量的遺伝子座を決定することが好ましい。  
25

さらに、上記量的遺伝子座解析システムにおいては、核酸アレイを用いたハイブリダイゼーションの結果を画像情報として読み取ることを可能とするスキャナを備えているとともに、得られた画像情報を解析し、網羅的な遺伝子の存在情報

を生成する画像情報処理部を備えていることが好ましい。

また、上記量的遺伝子座解析システムにおいては、入力部および出力部の少なくとも一方を備えることが好ましい。なお、上記スキャナも入力部の一つとして用いられる。このとき、上記入力部は、上記遺伝マーカー情報および上記表現型  
5 値の少なくとも一方を入力可能とすればよく、さらには、遺伝地図および遺伝地図作成情報の少なくとも一方を入力可能とすることが好ましい。

また、上記入力部としては、上記雑種個体の網羅的な遺伝子の存在情報、遺伝マーカー情報、および遺伝地図作成情報の少なくとも何れかを修正可能とする手  
動入力部を備えていることが好ましい。

10 一方、上記出力部としては、解析結果を画面上で表示するディスプレイ、および、解析結果を印刷するプリンタの少なくとも何れかを備えていることが好ましい。さらに、上記入力部および出力部として、外部の装置との間で情報の入出力を可能とする外部通信部を備えていることが好ましい。

上記量的遺伝子座解析システムにおいては、上記核酸アレイとして、一般的に  
15 は、固定化される核酸がDNAであるDNAアレイが用いられるが、もちろんこれに限定されるものではない。上記核酸アレイとしては、具体的には、例えば、マイクロアレイ、マクロアレイ、またはビーズアレイを挙げることができる。

本発明の利用方法は特に限定されるものではないが、例えば、上記量的遺伝子座解析システムを用いて、生物の量的形質を解析する量的形質解析方法や、上記  
20 量的遺伝子座解析システムを用いて、任意の形質の発現に関与する遺伝子を探索する遺伝子探索方法、あるいは、上記量的遺伝子座解析システムを用いる生物の品種改良方法等を挙げることができる。このとき、上記品種改良しようとする生物としては、実験用の動植物、家畜動物または農作物であることが好ましい。

また、本発明者は、上記課題に鑑み鋭意検討した結果、解析対象となる形質や  
25 遺伝子を先に指定し、これら形質や遺伝子にどのような遺伝子（群）が関与しているか否かを解析する場合、核酸アレイに固定化された遺伝マーカーのハイブリダイゼーション結果によって、個々の遺伝子の発現量を規定する遺伝要因を説明することが有効であることを見出し、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明にかかる遺伝子相互作用解析システムは、任意の生物種の遺

伝マーカーを固定化した核酸アレイに対して、集団系統ごとに得られる雑種個体から得られるゲノム試料をハイブリダイズさせることで得られる、雑種個体の網羅的な遺伝子の存在情報を、当該雑種個体の属する生物種の遺伝地図、および、当該生物種で明らかとなっている遺伝マーカー情報と照合し、集団系統ごとに存在する遺伝マーカーを特定する遺伝マーカー特定部と、特定された遺伝マーカーと上記核酸アレイに固定化されている遺伝マーカーとを照合することにより、核酸アレイにおける個々のスポットのハイブリダイゼーション結果を、解析用の遺伝マーカー情報であるスポットマーカー情報として生成するスポットマーカー情報生成部と、解析対象となる任意の表現型および遺伝子を指定した上で、当該表現型を数値化した表現型値と、同一の雑種個体から得られる発現プロファイル情報に含まれる発現している任意の遺伝子とが、複数のスポットマーカー情報と連鎖しているか否かを確認することにより、上記任意の表現型の遺伝要因を規定する遺伝要因規定部とを備えている（実施の形態6参照）。

上記遺伝子相互作用解析システムにおいては、上記核酸アレイとして、当該核酸アレイに固定されている複数の核酸分子が、当該核酸分子に対応するそれぞれの塩基配列のブロックが染色体上に並んでいる順序が確認可能に配列されている染色体座位確認可能アレイが用いられることが非常に好ましい。

さらに、上記遺伝子相互作用解析システムにおいては、上記遺伝地図作成情報に基づき、上記雑種個体の属する生物種の遺伝地図を作成する遺伝地図作成部を備えることが好ましい。このとき、上記遺伝地図作成情報として、少なくとも、当該生物種で知られている遺伝子および／または遺伝マーカーの名称と、当該遺伝子および／またはマーカーの染色体上の座乗位置とが用いられることが好ましい。

上記遺伝子相互作用解析システムにおいては、上記遺伝マーカー特定部で用いられる遺伝マーカー情報は、多型を有する遺伝マーカーであることが好ましく、より具体的には、上記遺伝マーカーがSNPまたはRFLPであることが好ましい。

また、上記遺伝子相互作用解析システムにおいては、上記スポットマーカー情報生成部では、ハイブリダイゼーションにより存在が明らかとなった遺伝マーカー

一のスポットのみを、スポットマーカ情報として生成すればよいが、このとき、上記スポットマーカ情報生成部では、遺伝マーカが核酸アレイに固定化されている位置情報もスポットマーカ情報に含めて生成することが好ましい。

さらに、上記遺伝子相互作用解析システムにおいては、同一の雑種個体から得られる網羅的な遺伝子の発現量について発現プロファイル解析することにより、当該雑種個体の発現プロファイル情報を生成する発現プロファイル情報生成部を備えることが好ましい。上記発現プロファイル情報生成部では、マイクロアレイ、マクロアレイ、ビーズアレイおよびディファレンシャルディスプレイの少なくとも何れかを用いて、遺伝子発現を網羅的に測定し、上記雑種個体の発現プロファイル情報を生成すればよいが、このとき、上記発現プロファイル情報生成部では、雑種個体の網羅的な遺伝子の存在情報を得るために用いられた核酸アレイあるいは同一のサンプルがスポットされた核酸アレイを用いて発現プロファイル情報を生成することが好ましい。

上記遺伝子の存在情報を得るための核酸アレイにおいても、発現プロファイルを得るための核酸アレイにおいても、固定化される核酸がDNAであるDNAアレイを好適に用いることができる。上記核酸アレイとしては、具体的には、マイクロアレイ、マクロアレイ、またはビーズアレイを挙げることができる。

また、上記遺伝子相互作用解析システムにおいては、上記遺伝要因規定部では、インターバルマッピングを行って得られた遺伝マーカ間の量的遺伝子座（QTL）により、上記任意の表現型の遺伝要因を規定すればよい。このとき、上記遺伝要因規定部では、さらに、表現型の遺伝要因を規定する情報として、当該遺伝マーカに関わる遺伝子の発現量を用いることができる。

さらに、上記遺伝子相互作用解析システムにおいては、入力部および出力部の少なくとも一方を備えていればよいが、このうち入力部は、上記雑種個体の網羅的な遺伝子の存在情報、上記遺伝マーカ情報、上記表現型値、および発現プロファイル情報の少なくとも何れかを入力可能とすればよく、遺伝地図および遺伝地図作成情報の少なくとも一方を入力可能とすることがより好ましい。

入力部の具体的な例は特に限定されるものではないが、例えば、上記入力部として、核酸アレイを用いたハイブリダイゼーションの結果を画像情報として読み

取ることを可能とするスキャナを備えている構成が挙げられる。このとき、得られた画像情報から遺伝子の発現量を解析し、網羅的な遺伝子の発現量情報を生成する画像情報処理部を備えていることが好ましい。なお、上記発現プロファイル情報を入力可能とする入力部として、上記スキャナを用いることができる。

5       また、上記入力部としては、上記雑種個体の網羅的な遺伝子の存在情報、遺伝マーカー情報、および遺伝地図作成情報の少なくとも何れかを修正可能とする手動入力部を備えていることが好ましい。

10       一方、上記出力部としては、解析結果を画面上で表示するディスプレイ、および、解析結果を印刷するプリンタの少なくとも何れかを備えていることが好ましい。さらに、上記入力部および出力部として、外部の装置との間で情報の入出力を可能とする外部通信部を備えていることが好ましい。

15       本発明の利用方法は特に限定されるものではないが、例えば、上記遺伝子相互作用解析システムを用いて、複数の遺伝子間の相互作用を解析する遺伝子相互作用解析方法や、上記遺伝子相互作用解析システムを用いて、任意の形質の発現に関与する遺伝子を探索する遺伝子探索方法、あるいは、上記遺伝子相互作用解析システムを用いる生物の品種改良方法等を挙げることができる。このとき、上記品種改良しようとする生物としては、実験用の動植物、家畜動物または農作物が好ましい。

20       本発明のさらに他の目的、特徴、および優れた点は、以下に示す記載によって十分わかるであろう。また、本発明の利益は、添付図面を参照した次の説明で明白になるであろう。

#### 図面の簡単な説明

25       図1は、本発明にかかるアレイが、支持体（基板）上に固定化される物質としてDNAが用いられるときの具体的な構成の一例を示す模式図である。

      図2（a）・（b）は、図1に示すアレイにおいて、ある特性を示す遺伝子が発現していることを示す例を模式的に示すアレイの概略平面図である。

      図3は、図2（a）・（b）に示す遺伝子の発現が示される品種を交雑させたときに、得られる分離集団とそこから選抜される特定の品種とについて、ある特



性を示す遺伝子が発現していることを示す模式図である。

図4は、本発明にかかるアレイが、支持体（基板）上に固定化される物質としてタンパク質が用いられるときの具体的な構成の一例を示す模式図である。

5 図5は、本発明にかかるアレイが、支持体（基板）上に固定化される物質として、タンパク質と特異的に相互作用する化合物（合成物質）が用いられるときの具体的な構成の一例を示す模式図である。

図6は、本発明にかかるアレイの一例であるビーズアレイの具体的な構成の一例を示す模式図である。

10 図7は、本発明にかかる遺伝子型解析表示システムの一例を示すブロック図である。

図8は、本発明にかかる遺伝子型解析表示システムにおいて、ディスプレイで表示される表示用情報の一例を示す図である。

図9は、本発明にかかる遺伝子型解析表示システムで行われる解析方法の一例を示すフローチャートである。

15 図10は、本発明にかかる量的遺伝子座解析システムの一例を示すブロック図である。

図11は、本発明にかかる量的遺伝子座解析システムで行われる解析方法の一例を示すフローチャートである。

20 図12は、本発明にかかる遺伝子相互作用解析システムの一例を示すブロック図である。

図13は、本発明にかかる遺伝子相互作用解析システムで行われる解析方法の一例を示すフローチャートである。

発明を実施するための最良の形態

25 〔実施の形態1〕

本発明にかかるアレイの一実施形態について、図1ないし図3に基づいて説明すれば、以下の通りである。なお、本発明はこれに限定されるものではない。

本発明にかかるアレイは、支持体上に固定化した物質を染色体の順に配列してなるものであり、本発明はアレイ技術に広く用いられる。なお、ここでいうアレ

イ技術とは、支持体上に複数種類の物質を規則的に配列させて固定化してなるアレイに関する技術を指すものとする。

本発明にかかるアレイは、固定化される物質の種類や、支持体の種類、用途等によって様々な分類ができるが、本発明では、上記固定化される物質の配列の順序に大きな特徴があるので、以下の説明では、この固定化される物質の種類別に  
5 本発明の代表的な一例を詳細に説明する。まず、本実施の形態では、固定化される物質が、核酸である場合を例に挙げて説明する。

#### ＜アレイの基本的構成＞

本発明が用いられるアレイの基本的な構成は特に限定されるものではない。上記のように、本発明にかかるアレイでは、支持体上に物質を固定化しているが、  
10 このとき用いられる支持体（担体）としては、上記物質を固定化できるものであれば特に限定されるものではなく、どのような形状や材質であってもよい。

上記支持体の材料としては、一般的には、例えば、ガラス、シリコンウエハ等の無機系材料；紙等の天然高分子；ニトロセルロースやナイロン等の合成高分子  
15 ；合成高分子や天然高分子を用いたゲル体；等を挙げることができる。また、支持体の形状も、上記物質を固定化できる十分な面積を有するものであれば特に限定されるものではないが、一般的には、可撓性が小さいかほとんど無い基板；可撓性を有する膜（メンブレン）；その中間となる可撓性基板；等のように、二次元的な広がりを持つものを好ましく用いることができる。なお、上記基板や膜  
20 の厚みについては特に限定されるものではなく、その材質や用途に応じて適宜設定すればよい。

さらに、本発明では、後述するように、ビーズアレイも用いることができるので、上記支持体としては、個々の生体物質または合成物質を固定化する小支持体の集団からなっている構成も採用することができる。この小支持体としては、例  
25 えば、各種ビーズを用いることができる。

ここで、これら小支持体は、集団（小支持体群）として一つの支持体を構成することになる。この小支持体群は、生体物質（核酸やタンパク質等）をプローブとして固定化させた上で、任意の液体に分散させた分散液（溶液と称してもよい）とし、この分散液を小容器に仕込んで用いればよい。これによって小支持体か

ら自由にデータを取得することができる。また、各小支持体には識別コードが付与されているので、これら小支持体からデータを取得するときには、識別コードも読み取る。したがって、この場合、各小支持体に固定化されている物質の順序は、識別コードに基づいて各小支持体から取得されたデータの並びに対応することになる。

本発明において、上記支持体に固定化される物質とは、任意の生物から得られた複数種類の生体物質、または、生体物質と相互作用する合成物質を指す。換言すれば、本発明にかかるアレイにおいて、支持体に固定化される物質は、少なくとも生物由来の生体物質に関連する物質である必要がある。生体物質に関連しない物質であれば、染色体にコードされる順序に配列させる基準が無いため、本発明に用いることはできない。

上記生体物質としては、具体的には、核酸またはポリペプチドを挙げることができる。このうち核酸としては、DNA、RNAを挙げることができる。なお、上記生体物質としてポリペプチドを用いる場合については、後述する実施の形態2で詳細に説明する。また、生体物質と相互作用する合成物質を用いる場合については、後述する実施の形態3で詳細に説明する。また、上記生体物質には、糖鎖等が含まれていてもよい。

本発明にかかるアレイでは、上記複数種類の生体物質または合成物質は、各生体物質に対応するそれぞれの塩基配列のブロックが染色体上に並んでいる順序が確認可能に配列されている。したがって、本発明にかかるアレイを、便宜上、染色体座位確認可能アレイ (chromosomal location recognizable array) と称する。本発明において、上記染色体上に並んでいる順序が確認可能に配列されている具体的な例としては、これら複数種類の物質における配列の順序が、染色体上に並んでいる順序となっている場合を挙げることができる。なお、この場合は、アレイ上で、上記物質の配列順序が染色体上に並ぶ順序を直接対応していることになるので、説明の便宜上、直接配列型と称する。

一方、上記染色体上に並んでいる順序が確認可能に配列されている他の例としては、アレイにおいて、上記物質の配列順序が染色体上に並ぶ順序を間接的に実現させる場合もあり、この場合を、説明の便宜上、間接配列型と称する。

### <直接配列型のアレイ>

本実施の形態では、まず、核酸のうちDNAが支持体に染色体の配列順序で並んでいる例（直接配列型の例）を挙げてより詳細に説明する。

例えば、任意の生物Zについてアレイを製造する場合、図1に模式的に示すように、生物Zの染色体に、10種類の遺伝子ABC1～10が存在しており、これらABC1～10遺伝子は、染色体上に序数順に並んでいると仮定する。このとき、上記ABC1～10遺伝子にそれぞれ対応するDNA断片（が得られているとすれば、アレイを製造するときには、これらDNA断片を基板上に規則的にスポットすることになる。なお、以下の説明では、必要に応じて、基板上に固定化された生体物質を「スポット」と称する。

上記DNA断片を基板上にスポットするときには、通常、スポッターまたはアレイヤーと呼ばれる装置が用いられるが、このスポッターを動作させるとき、対応する遺伝子が染色体に並んでいる順となるように上記各DNA断片をスポットするように制御すればよい。これによって、上記DNA断片（スポット）を、「生体物質に対応する塩基配列のブロックが染色体上に並んでいる順序」に支持体上に規則的に配列させて固定化することができる。

なお、上記「塩基配列のブロック」とは、染色体上の塩基配列に含まれるある程度の長さを有する領域を指し、典型的な例としては、「タンパク質をコードする遺伝子」に対応する領域を挙げることができる。もちろん上記「塩基配列のブロック」は「遺伝子」そのものに限定されるものではなく、BAC (Bacterial Artificial Chromosome) クローンのように大きなDNA断片でもよいし、一つのエクソンにのみ対応する領域であってもよいし、ESTのように、必ずしもタンパク質をコードする領域を含んでいるわけではない領域であってもよい。

また、上記染色体上に並んでいる順序とは、上記の例を挙げれば、単純にABC1、ABC2、ABC3・・・と各遺伝子が並んでいる順序であってもよいが、ABC1遺伝子の異なる断片がそれぞれ3個ずつ並び、ABC2遺伝子の異なる断片がそれぞれ3個ずつならび、ABC3遺伝子の異なる断片がそれぞれ3個ずつ並ぶような順序であってもよい。また、この例では、ABC1遺伝子の断片が3で、ABC2遺伝子の断片が2つで、ABC3遺伝子の断片が5つであって

もよい。すなわち、固定化されている物質全体として見たときに、支持体上において、これら物質が染色体上に並んでいる順序に対応していればよい。

また、図1に示す例では、1つの染色体に含まれる複数のDNA断片を用いた例を挙げたが、本発明はもちろんこれに限定されるものではなく、複数のDNA断片が複数の染色体にまたがって存在する場合でもよい。この場合でも、各DNA断片の染色体上に並んでいる順序が、確認可能にアレイ上に配列されていればよい。

また、図1に示す例では、複数のDNA断片がそのまま染色体上に並んでいる順序で配列している例を挙げているが、もちろん本発明はこれに限定されるものではない。例えば、目的に応じて、DNA断片が染色体順に並んでいる配列は一部のみにあってもよい。すなわち、固定されている物質が核酸に限らず、本発明にかかるアレイでは、複数種類の生体物質または合成物質の配列の少なくとも一部には、各生体物質に対応するそれぞれの塩基配列のブロックが染色体上に並んでいる順序で配列されている個所が含まれていればよい。

また、直接配列型においては、染色体上に並んでいる順序を確認可能とする手法は、上記染色体順での配列に限定されるものではない。例えば、支持体上に、各生体物質に対応するそれぞれの塩基配列のブロックが染色体上に並んでいる順序を指示する標識を適宜設ける等の手法も挙げることができる。

例えば、任意の生物から得られるDNA断片について、第1染色体から得られた10種類のDNA断片（スポット）を染色体順に配列させて第1列とし、第2染色体から得られた10種類のDNA断片（スポット）を染色体順に配列させて第2列としたとき、第1列と第2列とを区別できるような標識を設けても良い。さらには、後述する間接配列型アレイのように、各スポットがどのようなDNA断片を固定化しているのかを示すような情報を、標識として個々のスポットの近傍に設けても良い。

#### <間接配列型のアレイ>

次に、間接配列型のアレイについて説明する。このタイプのアレイでは、固定化されている生体物質または合成物質それぞれについて、各生体物質に対応するそれぞれの塩基配列のブロックが染色体上に並んでいる順序に対応する配列位置

情報を付与すればよい。これによって、固定化されている物質が任意の順で並んでいても、上記配列位置情報に基づいて、取得したデータを染色体順に並べ変えることができる。

より具体的な例としては、支持体が、個々の生体物質または合成物質を固定化する小支持体の集団からなっているビーズアレイ等を挙げることができる（ビーズアレイについては後に詳述）。この構成では、各小支持体に対して、各生体物質に対応するそれぞれの塩基配列のブロックが染色体上に並んでいる順序に対応する配列位置情報を付与する。

そして、使用時には、データの取得とともに、これら配列位置情報を読み取り、この配列位置情報に基づいて、取得したデータの配列の順序を、染色体上に並んでいる順序に並べ変える。このようにすれば、染色体上に並んでいる順序を確認することができるので、結果的に、小支持体に固定化されている物質の配列の順序を、染色体の順とすることができる。

なお、上記配列位置情報の具体的な構成としては、特に限定されるものではなく、小支持体に固定化されるDNAに対応するそれぞれの塩基配列のブロックが染色体上に並んでいる順序に対応するようになっていけばよい。

#### <固定化されるDNA>

本実施の形態では、生体物質としてDNAが用いられるが、このDNA（DNA断片）としては特に限定されるものではないが、遺伝マーカー、ゲノムDNA、制限酵素処理したゲノムDNA、cDNA、EST、または合成オリゴDNA等が好ましく用いられる。これらDNAは、遺伝地図または物理地図を基準として配列されていることが好ましい。例えば、上記遺伝マーカーを複数種類用いて遺伝マーカー群としたときに、これが遺伝地図を構成するようになっていると好ましい。これによって、遺伝地図を基準として上記DNA断片を基板上に配列させることができる。

上記遺伝マーカーおよび遺伝マーカー群としては、染色体上で遺伝的な標識として用いることができるものであれば特に限定されないが、具体的には特に限定されるものではなく、例えば、上記ESTを用いたESTマーカー、一塩基多型（SNP、Single Nucleotide Polymorphism）を含むSNPマーカー、制限酵

素断片長多型 (RFLP、Restriction Fragment Length Polymorphism) マーカ―やマイクロサテライトマーカ― (SSR (Simple Sequence Repeat) マーカ―) を挙げる事ができる。したがって、上記遺伝マーカ― (群) には、マーカ―として用いることのできる制限酵素処理したゲノムDNA、EST、または合成オリゴDNA等も含まれる。

支持体上に固定化される生体物質の数は特に限定されるものではないが、通常、数千個 ( $10^3$ ) レベルであることが多い。この固定化の数 (配列される数) は、スポッター等アレイの製造に用いられる装置の種類や、支持体 (基板) の面積等により大きく変動する。

なお、DNAアレイでは、固定化されたDNA断片に対応する遺伝子以外の遺伝子の発現に関する情報を得ることができない。そのため、より体系的・網羅的な遺伝子発現解析を試みる場合には、固定化される生体物質 (DNA断片) の数をできる限り多くすることが好ましい。

#### <本実施の形態におけるアレイの種類>

本発明が用いられるアレイの種類としては、公知のアレイであれば特に限定されるものではない。具体的には、例えば、マイクロアレイ、マクロアレイ、ビーズアレイまたはプロテインチップ等を挙げる事ができる。本実施の形態では、上記生体物質として核酸を用いているので、より具体的な例としては、DNAマイクロアレイやDNAマクロアレイ等を挙げる事ができる。

まず、DNAマイクロアレイは、DNAチップ等とも呼ばれ、固定化されるDNAはプローブ (探針) と呼ばれることが多い。マイクロアレイは、アレイのサイズがマクロアレイに比べて小さく高密度であるため、プローブとして固定する遺伝子 (DNA断片) 数を増やすことにより、より網羅的な遺伝子発現の解析が可能となる。

DNAマイクロアレイは、固定化されるDNAの種類に基づいて分類する方法もあるが、製造方法に基づいて分類することで、その構造上の違いを明確とすることができる。具体的には、製造方法に基づけば、マイクロアレイは、Stanford typeのものとAffymetrix typeのものとに大きく分けることができる。

Stanford typeのDNAマイクロアレイは、顕微鏡用のスライドガラスを基板

(支持体)として用い、これにスポッターでDNA溶液をスポットすることにより製造される。Stanford typeのDNAマイクロアレイでは、スポッターによりいつでもアレイを製造できるという利点があるが、スポッター等のハードウェアが未だ高価であったり、スポット用にプローブを多く準備する必要があつて生体物質を得るための準備が煩雑であったりする。

一方、Affymetrix typeのDNAマイクロアレイは、前記従来の技術で述べたように、スポッター等を用いて基板に上にDNA断片を固定するのではなく、半導体製造で用いられる微細加工技術、具体的にはフォトリソグラフ法を用いて、基板上で25mer程度のオリゴDNAを化学合成することにより製造される。

より具体的には、1遺伝子あたり、塩基配列データに基づいて11カ所（例えば、オオムギのDNAアレイは11カ所）から20カ所の25merを設定し、各25merに完全に一致するオリゴDNAと、13塩基目を意図的に違えた1塩基ミスマッチのオリゴDNAとを一組としてプローブとする。公表されているデータベースのデータに基づいて設計することにより、スポッター等を用いることなくアレイを製造することができる。しかも、プローブ（DNA断片）の長さが一定であり、配列が既知なため、ハイブリダイゼーションの強さに影響をあたえるGC含量も一定にすることができるという利点もある。ただし、データベース情報からプローブを合成するため、新たに解析しようとするクローンを改めて単離することが必要となる。

上述したように、本発明では、基板（支持体）上に固定化される核酸（生体物質）の配列の順序情報に大きな特徴があり、しかも、上記核酸として、合成オリゴDNAを含む様々なDNAを用いることが可能であるので、本発明の技術は、Stanford typeおよびAffymetrix typeの何れのDNAマイクロアレイに対しても好適に適用することができる。

上記DNAマイクロアレイの使用方法の一例について説明すると、まず、DNAマイクロアレイに、蛍光色素で標的したターゲットDNA（以下、ターゲットと略す）をハイブリダイズさせる。このとき、DNAマイクロアレイ上で、プローブと相補的な配列を含むターゲットの分子は、上記プローブの分子と相補的に結合（ハイブリダイズ）するが、それ以外のターゲットの分子は結合しない。そ



ここで、結合していないターゲットの分子を洗浄して除去することで、結合したターゲットの分子のみをマイクロアレイ上に残存させる。このターゲットの分子は蛍光色素で標識されているため、ターゲットの蛍光を、信号強度として測定し、ハイブリダイズしているプローブを同定する。

5        蛍光標識された上記ターゲットは、一般的には、比較したい2つの状態（第1の状態および第2の状態とする）の細胞からmRNAを抽出し、蛍光表示されたヌクレオチドの存在下で逆転写反応を実施することで作製される。このとき、上記2つの状態毎に、異なる検出波長を有する2種類の蛍光色素を用いる。したがって、ターゲット中には、発現量の多い遺伝子のcDNAが多く含まれていること  
10        になるので、上記蛍光の信号強度は、各状態における遺伝子の発現量に応じたものとなる。それゆえ、上記信号強度を測定すれば、特定の遺伝子の発現量を検出することが可能になる。

次に、上記DNAマクロアレイは、基本的には、DNAマイクロアレイと同様の構成を有しているが、支持体としてナイロンメンブレン等の一般的なメンブレン  
15        フィルターが用いられる点が異なっている。マクロアレイの利点としては、公知のプロット法に準じた方法で、ゲノムワイドで発現プロファイル解析を実施することができることや、スポットしたDNAをアルカリ変性処理してメンブレンフィルターに固定するため、マイクロアレイのようにハイブリダイゼーション中  
20        や洗浄中にDNAが剥離することがないこと等が挙げられる。それゆえ、マクロアレイとマイクロアレイとは、用途に応じて使い分けることが可能である。

上記マクロアレイの使用法の一例について説明する。マクロアレイの使用法は基本的に前記マイクロアレイと同様である。具体的には、まず、マクロアレイに、<sup>33</sup>P等のアイソトープで標的したターゲットをハイブリダイズさせる。そして、結合していないターゲットの分子を洗浄して除去し、結合したターゲット  
25        の分子のみをマクロアレイ上に残存させる。ここで、結合しているターゲットの分子は上記アイソトープで標識されているため、マイクロアレイとは異なり、スポットをイメージングプレートへ露光させ、このイメージングプレートからターゲットの発現量を信号強度として測定する。

他に、本発明の技術を適用できるアレイとしては、マスアレイが挙げられる。

マスアレイは、シリコン製の基板上にゲノムDNA断片を規則的に配列させて固定化したものであり、基本的に、上記DNAマイクロアレイと同様の構成を有している。このマスアレイはSNP解析のために開発されたものであり、その使用方法は、DNAマイクロアレイとは異なっている。

5       すなわち、マスアレイに標的のSNPの近傍に相当するオリゴヌクレオチドを合成してハイブリダイズさせる。これをプライマーとしてDNAポリメラーゼにより伸長させるとSNPに対応する1塩基のみが異なるDNA断片が生合成される。これを溶出しMALDIによってイオン化した後、TOS-MSにより塩基1個分の質量の違いを検出すればSNPの型を決定することができる。なお、MALDI-TOS-MSについては、実施の形態3で詳述する。

10       上記DNAマイクロアレイやマクロアレイは直接配列型であるが、間接配列型としては、前述したビーズアレイを挙げることができる。このビーズアレイは、小容器内で識別コードを付与したビーズの表面に核酸や抗体等のプローブを固定し、このビーズの識別コードを読み取ることで表面に固定されているプローブを  
15       特定するもので、2波長のレーザー光を用いれば100種類のビーズに対する定量が可能となる。このように、本発明にかかるアレイは、上記支持体が、個々の生体物質または合成物質を固定化する小支持体（上記の場合、ビーズ）の集団からなっているもよい。

20       このビーズアレイに本発明を適用する場合には、前述したように、各ビーズに対して、配列位置情報を含む識別コードを付与しておけばよい。これによって、他の手法と同様の測定が可能となる。また、ビーズアレイは、液相での検出が可能であるため、特にタンパク質等を効率的に定量する用途に有用である。この手法の詳細については実施の形態3で詳述する。

#### <ターゲットDNA>

25       ここで、上記ターゲットDNAについては、どのようなものを用いてもよい。通常、遺伝子の発現量を定量する場合には、ターゲットのサンプルとしてmRNA由来のcDNAまたはcRNAを用いることが一般的である。本発明では、これに加えて、例えば、制限酵素処理したゲノミックDNAを好ましく用いることができる。

通常のDNAアレイ（代表的にはDNAマイクロアレイ）による遺伝子発現解析は、原理的にはノーザンブロット法による解析となる。それゆえ、例えば、疾患の有無の違いを有する2つの検体の間で発現に差を有する遺伝子を検出するといった目的には有効である。しかしながら、2つの検体の間で遺伝的な差異を検出することを目的とすれば、遺伝子の発現に差が見られることと遺伝的な差異を有することとは必ずしも同一ではないため、このような目的には有効でない場合も多い。

また、既存のDNAマイクロアレイの手法を用いて大量の検体（系統）の比較発現解析を行うためには、供試する系統間で厳密に生育ステージをそろえたり（同調化したり）、または特定組織だけを回収したりする必要がある。さらに、ターゲットDNAとして用いられるmRNA（cDNA）は発現遺伝子の集合であり、供試した生育ステージで発現が特異的に活性化または抑制されている遺伝子のみの情報しか比較することはできない。

加えて、DNAマイクロアレイによる解析では、転写量には反映されない場合や、ごく限られた組織やステージでのみ発現している場合、あるいは転写量が少なくノーザンブロット法では検出できない場合等、ゲノム上で特定の遺伝子に変異が存在していても、検出が困難と予想される種々の例が報告されている。

一方、遺伝的な多様性を支配しているものは、必ずしも遺伝子のコード領域内の変異であるとは限らない。イントロンにおける挿入・欠失の有無や、プロモーター配列をはじめとした発現調節領域の構造的な違い（プロモーター活性の相違等）による例も数多く報告されている。

さらに、本発明の利用の一例としての品種改良（育種）では、例えば、後述するイネ科植物を育種対象として好適に用いることができるが、同じイネ科植物の中でも、例えばオオムギは、ゲノムサイズがイネの10倍以上もあり、ゲノムの大部分を占める非遺伝子領域が種内の多様性に寄与している可能性も十分考えられている。

本発明にかかるアレイがDNAアレイであれば、固定化されているDNA断片（生体物質）が染色体上に並んでいる順序となるように配列されている。そのため、本発明にかかるアレイを用いることにより、染色体上のどの部分が組み換わ

っているか否かを1回の試行で把握することが可能となる。そこで、本発明にかかるアレイにより解析を行う場合、サザンブロット法を適用するように、ターゲットDNAを調製すればよい。これにより、上述した従来のノーザンブロット法で生ずる問題を解消できるだけでなく、遺伝子コード領域以外の構造変異をも効率的に検出することが可能になる。

サザンブロット法を適用するようにターゲットDNAを調製する方法は特に限定されるものではなく、ゲノミックDNAを公知の方法で断片化処理すればよいが、具体的には、制限酵素処理したゲノミックDNAをターゲットDNAとして用いればよい。換言すれば、本発明にかかるアレイを用いてRFLP解析を行えばよい。

ここで、制限酵素で消化したゲノムDNAは、mRNA(cDNA)の場合と比較して、プローブDNAの各断片間でのサイズの違いが非常に大きくなる。これは、長さの違いを多型として検出する上で、例えば、500bpと5kbpとの差をアレイ上で正確に検出できるか否かという点では欠点となる可能性がある(アレイの画像情報を読み取る画像読取手段の検出感度が問題となる)。

そこで、ゲノムDNAを制限酵素処理した後、サイズ分画したものをターゲットDNAとして用いる。これにより長さの違いを多型として有効に検出することが可能となり、本発明にかかるアレイを用いてサザンブロット法による解析を有効に行うことができる。

上記サイズ分画の方法は特に限定されるものではなく、制限酵素処理したゲノミックDNAを目的の範囲内の大きさに有効に分画できる方法であればどのような技術も用いることができる。例えば、遠心チューブを利用した市販の核酸精製カラムキット等を利用すればよい。また、PCRによって特定範囲内のサイズを有するDNA断片を特異的に増幅するように条件設定することでサイズ分画を行うこともできる。さらに、上記ゲノミックDNAのラベリング方法も特に限定されるものではなく、PCR等を用いて、公知の方法でラベリングすればよい。

#### <アレイの製造方法>

本発明にかかるアレイの製造方法は、少なくとも、任意の生物から得られた複数種類の生体物質、または、生体物質と相互作用する合成物質を、支持体上に規

則的に配列させて固定化する工程とを含んでおり、この工程では、固定化される上記生体物質または合成物質を、生体物質に対応する遺伝子を基準として、当該遺伝子が上記生物の染色体にコードされている順序にしたがって配列させる方法であればよい。

5       本実施の形態のように、生体物質として核酸を用いる場合には、例えば、ゲノムDNAを調製し、このゲノムDNAを制限酵素で切断して断片化した上で、このDNA断片を溶液としてスポッターで支持体上にスポットしていけばよい。このとき、前述したように、スポッターにより、対応する遺伝子の染色体情報を識別可能とするように上記各DNA断片をスポットすればよい。

10       上記スポッターとしては、公知の装置を好適に用いることができ、特に限定されるものではないが、具体的には、例えば、キャピラリー状のペンでDNA溶液を基板上に打ち付けるタイプ、インクジェットによりDNA溶液を基板上にプロットするタイプ等を挙げることができる。

15       また、ビーズアレイのように支持体がビーズ等の小支持体の集団（小支持体群）からなる場合には、各ビーズにDNA等を固定化するとともに、固定化したDNAが染色体上でどのような位置に対応するか、という配列位置情報を識別コードとともに当該ビーズに加えればよい。このようにして得られたビーズ群は、公知の液体に分散させ、ビーズ溶液とし、これを小容器に仕込めば、ビーズアレイとすることができる。

20       ＜本発明にかかるアレイの利用方法＞

25       本発明にかかるアレイの利用方法は特に限定されるものではないが、例えば、生体物質としてDNAを用いたアレイを用いて、生物を交雑して得られる雑種から目的の形質を含む染色体断片を同定する（遺伝子型を同定する）用途や、品種改良しようとする生物を交雑して得られる雑種から目的の形質を保持する品種を選抜する用途に好適に用いることができる。

従来のアレイでは、固定化されるDNA断片の配列の順序には、特に規則性がなくランダムであるため、固定化されたDNA断片それぞれについての発現量等を解析することは可能である。ここで、上記交雑に由来する雑種においては、個々の遺伝子は染色体上の交叉が起きた部分から次の交叉が起きた部分までブロッ

ク単位で遺伝する。そのため、遺伝子型の同定や品種改良等における品種選抜という用途では、個々の形質を保持しているか否かの判断だけでなく、染色体のどの部分がどの程度組み換わったか否かの判断や、目的以外の組換えが起こっているか否かの判断が必要となる。したがって、DNA断片がランダムに配列されている従来のアレイを品種改良等の選抜に用いることは効率的でない。

これに対して、本発明にかかるアレイでは、固定化されているDNA断片（生体物質）が染色体上に並んでいる順序となるように配列されている。そのため、本発明にかかるアレイを用いることにより、染色体上のどの部分が組み換わっているか否かを1回の試行で把握することが可能となる。その結果、交雑により得られた分離集団の中から、目的とする形質を有する個体のみを正確に選抜することができる。しかも、本発明にかかるアレイを用いれば、雑種世代における染色体の組み換えが容易に推定できるので、遺伝子群のブロック単位の導入あるいはブロック内の遺伝子の改変が可能となる。

また、本発明にかかるアレイを用いれば、染色体上のどの部分がどう組み換わったのかといった、組み換えの様式が的確に把握できる。そのため、雑種あるいは自然集団の中で組み換え頻度の少ない染色体上の保守的な部分を同定して、効率的に部分内の組み換えを促すことも可能となる。

さらに、従来のアレイを用いた解析において、あるスポットに対するシグナルが得られなかった場合、本当にそのスポットで遺伝子が発現していないのか、解析の実験上のミスによりシグナルが得られていないのかについては、改めて確認しなければ正確には判定することはできなかった。これに対して、本発明にかかるアレイでは、固定化されているDNA断片（生体物質）の染色体上の順序が確認できるように配列されているため、上記のような実験上でのミスを容易に判定することが可能となる。

具体的には、例えば、シグナルが得られなかったスポットの前後のスポットでシグナルが得られたとする。本発明にかかるアレイでは、各スポットは、染色体上に並んでいる順序が確認できるように配列されている。通常、染色体上に直線上に近接して並んでいる遺伝子のうち一つの遺伝子のみが組換わるためには二つの組換えがごく近傍で起こらなくてはならない。このような現象が起こる確率が極

めて低いため、シグナルを得られなかったという結果は、実験上のミスによるものであると判断される。このように、本発明にかかるアレイでは、あるスポットに対するシグナルが得られなかった場合でも、実験上でのミスか否かを容易に判定することが可能となるため、解析の精度を向上することができる。

5       本発明にかかるアレイを用いた選抜方法の一例について模式的に説明する。例えば、オオムギのDNA断片を用いて本発明にかかるDNAマイクロアレイを製造したとする。このとき、図2(a)に示すように、本発明にかかるDNAマイクロアレイにおいて、図中黒く塗りつぶされたスポットXが存在していれば、醸造特性を示す遺伝子が発現していることを示し、図2(b)に示すように、図中斜線を引いたスポットYが存在していれば、病害抵抗性を示す遺伝子が発現して  
10       いることを示すものとする。

      本発明にかかるDNAマイクロアレイでは、各スポットが染色体上に並んでいる順序となるように配列されているため、上記スポットX・Yの位置は固定される。例えば、図2(a)では、スポットXは最上段左から1・2個目および5・  
15       6個目のスポットと最下段右から1・2個目のスポットであり、図2(b)では、スポットYは最上段左から3・4個目のスポットである。

      図3に示すように、上記スポットXで表される醸造特性を示す遺伝子が発現している品種（対応するDNAマイクロアレイは図上左）と、上記スポットYで露わされる病害抵抗性を示す遺伝子が発現している品種（対応するDNAマイクロアレイは図上右）とを交雑すると、例えば、同図の下に示す4つのDNAマイクロアレイで表されるような分離集団が得られるとする。この分離集団から、醸造特性および病害抵抗性を示す双方の遺伝子が発現している品種は、DNAマイクロアレイを用いた解析結果から、容易に選抜することができる（図3では、点線で囲んだ下左上のDNAマイクロアレイに対応する品種）。

25       また、ゲノムの他の領域についても、どちらの交雑親由来の染色体断片を有するかが容易に判別できる。そのため、例えば、雑種に、図2(a)に示す品種を戻し交雑することで、図2(a)に示す品種の最上段左から1・2個目および5・6個目のスポットと最下段右から1・2個目のスポットとを全て有しつつ、図2(b)に示す品種の最上段左から3・4個目のスポットを含む品種を選抜して

育成することが容易に可能となる。

本発明にかかるアレイを利用できる生物としては、特に限定されるものではなく、植物、動物または微生物の何れであってもよい。特に、染色体を有しメンデル遺伝する生物であれば、本発明にかかるアレイを上記選抜方法に利用することができる。メンデル遺伝する生物としては、特に限定されるものではないが、商業的に利用され品種改良の要求の高い生物を挙げることができる。

このような生物としては、植物として、各種作物（農林水産業で生産される植物、農作物）を挙げるすることができる。具体的には、例えば、イネ、コムギ、オオムギ、ライムギ、ライコムギ、トウモロコシ等のイネ科植物；ノリ等の海藻類；各種野菜・花卉類；スギ、ヒノキ等の材木類；等を挙げるすることができる。また動物としては、各種家畜動物を挙げるすることができる。具体的には、ウシ、ヒツジ、ブタ等の家畜哺乳類；ニワトリ、ウズラ等の家畜鳥類；ハマチ、タイ、コイ、アユ等の魚類；ミツバチ、カイコなどの家畜昆虫類；カキ、アワビ、ホタテガイ等の貝類；等を挙げるすることができる。さらに微生物としては、大腸菌等の細菌類、酵母、糸状菌、放線菌、担子菌等を挙げるすることができる。

上記の中でも、イネ科植物には、イネ、コムギ、トウモロコシまたはオオムギ等、国際的に広く栽培されている穀物が含まれており、重要な戦略作物であるものが多い。それゆえ、これらイネ科植物の品種改良に本発明を適用すれば、優れた形質を有する品種を効率的に得ることができる。

また、本発明にかかるアレイを利用できる生物には、実験用に用いられる動植物（実験動物・実験植物）等も含まれる。実験動物としては、具体的には、例えば、マウス、ラット、ショウジョウバエ、線虫等を挙げるすることができる。また、実験植物としては、具体的には、例えば、シロイヌナズナ等を挙げるすることができる。

さらに、本発明においては、本発明にかかるアレイを用いて遺伝子型を同定する場合には、上記生物がヒトであってもよい。言い換えれば、本発明にかかるアレイを利用すれば、遺伝子型を効率的に同定できるので、遺伝子診断方法として好ましく用いることができる。

〔実施の形態２〕



本発明にかかるアレイの他の実施形態について、図4に基づいて説明すれば、以下の通りである。なお、本発明はこれに限定されるものではない。

前記実施の形態1では、生体物質として核酸を用いた例を挙げて本発明を説明したが、本発明はこれに限定されるものではなく、上記生体物質としてポリペ  
5 チドを用いることができる。

#### <生体物質としてのポリペプチド>

本実施の形態でいうところのポリペプチドとは、アミノ酸がペプチド結合した  
高分子化合物であれば特に限定されるものではないが、具体的には、タンパク質  
またはその断片、あるいはオリゴペプチドを挙げることができる。なお、ここで  
10 いうタンパク質の断片とは、完全なタンパク質の部分的なアミノ酸配列からなる  
ポリペプチドを指すものとする。また、オリゴペプチドとは、分子量5000以  
下のポリペプチドを指すものとする。なお、上記タンパク質には、多量体を形成  
するタンパク質の複合体も、単量体のタンパク質も含むものとする。

本実施の形態におけるアレイでも、前記実施の形態1と同様、支持体上に固定  
15 化されるポリペプチドの配列の順序は、各ポリペプチドに対応するそれぞれの塩  
基配列のブロックが染色体上に並んでいる順序となっている。

例えば、任意の生物Zについてアレイを製造する場合、図4に模式的に示すよ  
うに、図1と同様、生物Zの染色体に、10種類の遺伝子ABC1～10が存在  
しており、これらABC1～10遺伝子は、染色体上に序数順に並んでいると仮  
20 定する。このとき、上記ABC1～10遺伝子からそれぞれ転写翻訳（図中矢印  
で記載）される10種のタンパク質が得られているとすれば、アレイを製造する  
ときには、これらタンパク質を、上記染色体に並んでいる順序で基板上に規則的  
にスポットする。

なお、上記「塩基配列のブロック」は、本実施の形態では、「タンパク質をコ  
25 ードする遺伝子」に対応する領域であってもよいし、タンパク質の断片となるポ  
リペプチドのみに対応する領域であってもよい。

生体物質がタンパク質である場合には、その具体的な種類は特に限定されるも  
のではないが、酵素、キナーゼ、抗体、受容体、またはSH3領域を有するタン  
パク質等が好ましく用いられる。これらタンパク質は、前記実施の形態1におけ

るDNAと同様に、遺伝地図または物理地図を基準として配列されていることが好ましい。

#### <本実施の形態におけるアレイの種類>

本実施の形態におけるアレイの具体的な種類は特に限定されるものではなく、  
5 支持体上に上述したポリペプチドを、対応するそれぞれの塩基配列のブロックが  
染色体上に並んでいる順序に配列させて固定化したものであればよい。具体的  
には、ペプチドアレイ、キナーゼアレイ、抗体アレイ、酵素アレイ、SH3ドメイ  
ンアレイ、受容体アレイ等のように、固定化されるポリペプチドの種類に応じた  
各種のアレイを挙げることができる。

10 上記ペプチドアレイは、支持体上にオリゴペプチドを固定化したものである。  
このオリゴペプチドは合成されたものであってもよいし、タンパク質等のポリペ  
プチドを公知の方法により分解または切断して得られるものであってもよい。

15 上記キナーゼアレイは、複数種類のタンパク質キナーゼを精製して支持体上に  
配列して固定化したものであり、キナーゼによるリン酸化のパターンを見わける  
ことで、細胞内のタンパク質動態を観察したり、タンパク質のリン酸化標的を包  
括的に探索したりすることができる。

上記抗体アレイは、支持体上に複数種類の抗体を配列して固定化したものであ  
り、抗体チップとも称する。この抗体アレイとタンパク質とを結合させることで  
、標的抗体と相互作用するタンパク質を検出することができる。

20 上記酵素アレイは、支持体上に複数種類の酵素を配列して固定化したものであ  
り、各種酵素の活性をモニタリングする等の目的で用いることができる。

上記SH3ドメインアレイは、SH3領域を有するタンパク質群を支持体上に  
配列して固定化したものであり、代表的なものとしてPanomics社製のアレイを  
挙げることができる。

25 上記SH3 (Src Homology 3) ドメインは、Srcタンパク質内に含まれる比  
較的短い保存領域である。具体的には、50～70のアミノ酸残基からなり、ア  
ンチパラレルβ鎖が5～6本密集したβバレル構造を有している。SH3ドメイ  
ンは、6～12残基の共通配列を含んだペプチド領域 (SH3リガンドと称する  
) を介して、標的タンパク質と特異的に結合する。SH3リガンドとしては、二

つのタイプが知られているが、これらは何れもプロリンを含んでおり、このプロリンが親水性のポケットを占領するようにして結合する。

SH3ドメインを含むタンパク質としては、ヒトでは約408種類が知られており、各種相互作用の仲介役として、細胞間コミュニケーションや細胞表面から核へのシグナル伝達を担っている。したがって、SH3ドメインアレイを用いることにより、特定のタンパク質がどんなシグナル伝達に関与しているか、また特定の反応経路内でいくつかのタンパク質が関与しているのかを確認することが可能となる。

上記受容体アレイは、各種細胞応答に関わる受容体（レセプター）タンパク質を支持体上に配列して固定化したものである。受容体としては特に限定されるものではなく、ホルモン、神経伝達物質、オータコイド等の外来性の物質や、物理的、化学的刺激が何らかの細胞応答を引き起こすときに、その物質または刺激を特異的に認識するものであればよく、必ずしもタンパク質に限定されないが、一般的には、細胞膜、小器官膜あるいは細胞質内に存在する特定の物質や刺激で活性化されるタンパク質が多い。

ここで、上述した各アレイの中には、いわゆるバイオリジカルチップに分類されるものも含まれる。バイオリジカルチップはプロテインチップの一種である。

プロテインチップは、タンパク質の解析に適した様々な化学的性質をスポット表面に固定化した小型のアレイ（チップ）であり、その解析の目的から、ケミカルチップとバイオリジカルチップの二種類に大きく分けることができる。バイオリジカルチップは、タンパク質等のポリペプチドについて、特異的な結合（相互作用）を解析するために用いられるものであり、固定化される物質としては、ポリペプチドと相互作用することが可能な物質、例えば、抗体、受容体、DNA等を挙げるができる。したがって、前記実施の形態1で説明した核酸を固定化したアレイも、その目的（用途）から見れば、バイオリジカルチップに含まれるものもある。なお、ケミカルチップについては実施の形態3にて後述する。

なお、バイオリジカルチップには、カルボニルジイミダゾール基、またはエポキシ基が表面に固定化されたタイプが存在する。これら官能基（化合物）は、抗体、受容体タンパク質、DNA等の生体物質を簡単に固定化することができる。

それゆえ、解析目的に応じたアレイを容易に製造することができる。換言すれば、本発明にかかるアレイは、支持体の表面に生体物質（あるいは合成物質）を直接固定化してもよいが、上記バイオリジカルチップのように、支持体表面と生体物質との双方と良好に結合できるようリガンド化合物を介在させて、当該生体物質を固定化させてもよい。

### 〔実施の形態3〕

本発明にかかるアレイのさらに他の実施形態について、図5および図6に基づいて説明すれば、以下の通りである。なお、本発明はこれに限定されるものではない。

前記実施の形態1では、生体物質として核酸を用いた例を挙げ、前記実施の形態2では、生体物質としてポリペプチドを用いた例を挙げて本発明を説明したが、本発明はこれに限定されるものではなく、上記生体物質と相互作用する合成物質を用いてもよい。

### ＜合成物質の例＞

上記合成物質としては、生体物質と相互作用する物質であれば特に限定されるものではない。具体的には、例えば、タンパク質と相互作用する疎水性基、陽イオン交換基、陰イオン交換基、金属イオン固定基、順相基等を有する化合物を挙げることができる。また、合成オリゴヌクレオチドや合成オリゴペプチドも上記合成物質に含めてもよい。

本実施の形態におけるアレイでも、前記実施の形態1や実施の形態2と同様、支持体上に固定化される合成物質の配列の順序は、当該合成物質と相互作用する生体物質に対応するそれぞれの塩基配列のブロックが染色体上に並んでいる順序となっている。

例えば、任意の生物Zについてアレイを製造する場合、図5に模式的に示すように、図1や図3と同様、生物Zの染色体に、10種類の遺伝子ABC1～10が存在しており、これらABC1～10遺伝子は、染色体上に序数順に並んでいると仮定する。このとき、上記ABC1～10遺伝子からそれぞれ転写翻訳（図中矢印で記載）される10種のタンパク質が得られているとし、さらに各タンパク質が、ある化合物と特異的に相互作用するとすれば、アレイを製造するときに

は、これら化合物を、相互作用するタンパク質をコードする遺伝子が上記染色体に並んでいる順序で基板上に規則的にスポットする。

上記合成物質を用いて得られるアレイの具体的な例としては、前記実施の形態で述べたプロテインチップに含まれるケミカルチップを挙げることができる。ケミカルチップは、主にタンパク質の発現解析や精製・同定という用途に用いられ、バイオリジカルチップは、主にタンパク質の特異的な結合（相互作用）の評価等に用いられる。

前述したように、プロテインチップにはケミカルチップおよびバイオリジカルチップがあるが、このうちケミカルチップは、その表面に、疎水性基、陽イオン交換基、陰イオン交換基、金属イオン固定基、または順相基等の官能基（化合物）が固定化されている。このケミカルチップは、一般的なクロマトグラフィーと同様に、一定の反応条件下でサンプルと接触させることにより、これらの官能基が当該サンプル中のタンパク質を捕捉することができる。上記サンプルとしては、タンパク質を含む（可能性がある）ものであれば特に限定されないが、例えば、血清、尿、髄液、関節液、唾液、組織ホモジネート等の生体サンプル；細胞培養上清、培養細胞破碎液等の培養液サンプルを挙げることができる。

#### <プロテインチップシステム>

上記ケミカルチップだけでなく、前記実施の形態2で述べたバイオリジカルチップも含めて、広義のプロテインチップを解析する方法は特に限定されるものではないが、一般的には、プロテインチップシステムが用いられる。このプロテインチップシステムの具体的な構成としては特に限定されるものではないが、一般的には、上記プロテインチップと、測定に用いるプロテインチップリーダーと、測定・解析のためのソフトウェアを装備したコンピュータとからなる構成を挙げることができる。もちろん、これら以外の構成が含まれていてもよい。

上記プロテインチップリーダーとしては、プロテインチップからタンパク質の発現解析や相互作用評価を何らかのデータとして読み取ることができる装置であれば特に限定されるものではないが、一般的には、飛行時間型質量分析装置（TOF-MS）を用いることができる。この装置では、サンプルをイオン化し、一定の加速電圧により運動エネルギーを与えて真空度の高い管内を自由飛行させて

検出器に到達させる。この飛行時間を測定することによりサンプルの質量を分析し、これによって、プロテインチップからタンパク質の発現解析や相互作用評価等のデータを読み取る。

上記TOS-MSにおいて、用いられるサンプルは、タンパク質等のポリペプチドであればよいが、もちろんDNA等の核酸であってもよい。ここで、このような生体物質のサンプルをイオン化する方法は特に限定されるものではないが、一般的には、MALDI（マトリクス支援レーザー脱離イオン化）法が用いられる。このMALDI法は、サンプルを金属板（支持体）に固定化しておき、レーザー光を照射することでイオン化する。このMALDI法を用いたTOS-MSをMALDI-TOF-MSと称する。

上記プロテインチップシステムを用いた解析方法の一例について説明すると、まず、1～数百 $\mu$ lのサンプルをプロテインチップ上のスポットに添加する。次に、プロテインチップの表面を所定の条件で洗浄し、当該プロテインチップ表面に固定されている物質と相互作用していない物質を除去する。これにより、特定の条件下でスポット上に捕捉されるタンパク質が選択されるので、次に、各スポットをMALDIでイオン化し、TOS-MSにより分子量を測定する。得られた各スポットからの結果は、上記コンピュータによりデータ解析する。

上記プロテインチップシステムでは、少量のサンプルからラベルやタグを使わずに、多検体を、短時間に、定量的に、その質量数に基づいて簡単に分析することが可能である。しかも、粗サンプル中の微量成分を前処理なしで測定することが可能であり、また、スポット上に残存する塩類を測定前に、簡単に除去することができる。このようなシステムは、各種疾患マーカータンパク質の探索や毒性の評価、または特定の分子と相互作用する分子（薬剤候補物質）のスクリーニング等の用途で好適に用いることができる。

しかも、このとき、プロテインチップ上に固定化されている合成物質や生体物質が染色体にコードされている順で配列されていれば、前記実施の形態1で述べたような利点を得られるので、プロテインチップシステムの解析のレベルを向上させたり、より実用的な用途に用いたりすることができる。

<ビーズアレイシステム>

さらに、タンパク質を効率的に同定するためのアレイとしては、前記実施の形態1で述べたビーズアレイを挙げることができる。このビーズアレイは、図6に示すように、マイクロタイタープレートのセルを小容器とし、この小容器内に識別コードを付与したビーズを複数仕込む（図中10個）。このビーズの表面には、

5 生体物質や合成物質（この例では抗体）等のプローブが固定されている。

このビーズには、前述した配列位置情報が加えられているので、識別コードを読み取ることにより、表面に固定されているプローブがどのタンパク質か（図中では、ABC1～10遺伝子からそれぞれ転写翻訳（図中矢印で記載）される10種のタンパク質の何れであるか）を特定することができる。特に、2波長のレーザー光を用いれば100種類のビーズに対する定量が可能となる。

10

この手法は液相での検出が可能なので、例えば特にタンパク質などの定量に有用である。代表的なものとして日立ソフトウェアエンジニアリング社製蛍光マイクロビーズアレイシステムLuminexを挙げることができる。

このビーズアレイシステムの具体的な構成としては特に限定されるものではないが、一般的には、上記プローブの入ったプレート、蛍光検出に用いる分析装置、測定・解析のためのソフトウェアを装備したコンピュータとからなる構成を挙げることができる。もちろん、これら以外の構成が含まれていてもよい。

15

上記分析装置としては、ビーズアレイからタンパク質の発現解析や相互作用評価を何らかのデータとして読み取ることができる装置であれば特に限定されるものではないが、一般的には、フローメトリー機構およびレーザー光による蛍光検出を有する装置を用いることができる。この装置では、ビーズの色調を識別できるので、それぞれに異なる抗体を固定して、標識したサンプルと結合させ、フローサイトメトリーによって、ビーズ1個ごとのサンプル結合量を測定することができる。これらの反応をビーズ1種類について数百個集計してサンプルを定量する。

20

25

上記ビーズアレイシステムにおいて用いられるサンプルは、タンパク質等のポリペプチドであればよいが、もちろんDNA等の核酸であってもよい。このビーズアレイシステムは、少量のサンプルから液相において、多検体を、短時間に、定量的に分析することが可能である。しかも、このとき、ビーズアレイ上に固定

化されている合成物質や生体物質を染色体にコードされている配列に従って解析すれば、前記実施の形態1で述べたような作用・効果を得ることができる。

5       なお、本発明は、上述した各実施の形態に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、異なる実施の形態にそれぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施の形態についても、本発明の技術的範囲に含まれることはいうまでもない。したがって、本実施の形態3では、本発明にかかるアレイとしてビーズアレイおよびプロテインチップを例に挙げたが、上記プロテインチップシステムのようなアレイ解析装置は、前記実施の形態1におけるDNAマイクロアレイ等にも応用できることは言うまでも無い。

10       以上のように、本発明にかかるアレイは、生体物質や生体物質と相互作用する合成物質を、生体物質に対応する遺伝子を基準として染色体上にコードされている順序で配列させて解析する構成である。それゆえ、品種改良の選抜等より実用的な用途に用いることが可能であるとともに、アレイの解析の信頼性を向上させること等も可能となるという効果を奏する。

15       なお、上述した本発明にかかるアレイでは、その利用目的に応じてキット化されていてもよい。例えば、実施の形態1で説明したDNAアレイを品種改良に用いる場合には、本発明にかかるアレイとターゲットDNAを調製する試薬や器材等とを組み合わせることでキット化してもよい。

#### 〔実施の形態4〕

20       本発明にかかる遺伝子型解析表示システムの一実施形態について図7ないし図9に基づいて説明すると以下の通りである。なお、本発明はこれに限定されるものではない。

25       本発明にかかる遺伝子型解析表示システムは、任意の生物種において、個体Aと個体Bとの交雑（ $A \times B$ ）に由来する雑種個体について、核酸アレイによるハイブリダイゼーション結果を用いて解析を行い、当該雑種個体の染色体上のどの位置で交叉が起こっているかを視覚的に表示するシステムである。

      本発明にかかる遺伝子型解析表示システムの具体的な構成は特に限定されるものではないが、具体的には、例えば、図7に示すように、画像情報処理部（画像情報処理手段）11、遺伝地図作成部（遺伝地図作成手段）12、遺伝子型由来



判別部（遺伝子型由来判別手段）13、表示用情報生成部（表示用情報生成手段）14、制御部（制御手段）15、メモリ（記憶手段）16、スキャナ（画像読取手段、入力手段）21、外部通信部（外部情報入出力手段）22、記録媒体読書部（記憶手段、入力手段、出力手段）23、手動入力部（手動入力手段）24、プリンタ（画像形成手段、印刷手段、出力手段）25、ディスプレイ（画像表示手段、出力手段）26等を備えている構成を挙げることができる。上記構成の遺伝子型解析表示システムは、入力部、出力部、解析部（解析手段）10に大別することができる。

#### （I）核酸アレイ

##### ＜核酸アレイの具体的な構成＞

本発明では、所望の生物種において、個体Aと個体Bとの交雑（ $A \times B$ ）に由来する雑種世代の個体について、核酸アレイにより遺伝子の発現量を分析し、その結果を用いて遺伝子型を解析し表示する。ここで、本発明で用いられる核酸アレイとしては、特に限定されるものではなく、公知の核酸アレイを好適に用いることができる。具体的には、例えば、マイクロアレイ、マクロアレイ、ビーズアレイ等を挙げることができる。本実施の形態では、上記核酸としてDNAを用いているので、より具体的な例としては、DNAマイクロアレイやDNAマクロアレイ等のDNAアレイを挙げることができる。

まず、DNAマイクロアレイは、DNAチップ等とも呼ばれ、固定化されるDNAはプローブ（探針）と呼ばれることが多い。マイクロアレイは、アレイのサイズがマクロアレイに比べて小さく高密度であるため、プローブとして固定する遺伝子（DNA断片）数を増やすことにより、より網羅的な遺伝子発現の解析が可能となる。

DNAマイクロアレイは、固定化されるDNAの種類に基づいて分類する方法もあるが、製造方法に基づいて分類することで、その構造上の違いを明確とすることができる。具体的には、製造方法に基づけば、マイクロアレイは、Stanford typeのものとAffymetrix typeのものと大きく分けることができる。

Stanford typeのDNAマイクロアレイは、顕微鏡用のスライドガラスを基板（支持体）として用い、これにスポッターでDNA溶液をスポットすることによ

り製造される。Stanford typeのDNAマイクロアレイでは、スポッターによりいつでもアレイを製造できるという利点があるが、スポッター等のハードウェアが未だ高価であったり、スポット用にプローブを多く準備する必要があつて核酸を得るための準備が煩雑であったりする。

5 一方、Affymetrix typeのDNAマイクロアレイは、スポッター等を用いて基板に上にDNA断片を固定するのではなく、半導体製造で用いられる微細加工技術、具体的にはフォトリソグラフ法を用いて、基板上で25mer程度のオリゴDNAを化学合成することにより製造される。

より具体的には、1遺伝子あたり、塩基配列データに基づいて11カ所から20カ所の25merを設定し、各25merに完全に一致するオリゴDNAと、13塩基目を意図的に違えた1塩基ミスマッチのオリゴDNAとを一組としてプローブとする。公表されているデータベースのデータに基づいて設計することにより、スポッター等を用いることなくアレイを製造することができる。しかも、プローブ（DNA断片）の長さが一定であり、配列が既知なため、ハイブリダイゼーションの強さに影響をあたえるGC含量も一定にすることができるという利点もある。ただし、データベース情報からプローブを合成するため、新たに解析しようとするクローンを改めて単離することが必要となる。

本発明では、核酸アレイとしては、上記Stanford typeおよびAffymetrix typeの何れのDNAマイクロアレイであっても好適に用いることができる。

20 上記DNAマイクロアレイの使用法の一例について説明すると、まず、DNAマイクロアレイに、蛍光色素で標的したターゲットDNA（以下、ターゲットと略す）をハイブリダイズさせる。このとき、DNAマイクロアレイ上で、プローブと相補的な配列を含むターゲットの分子は、上記プローブの分子と相補的に結合（ハイブリダイズ）するが、それ以外のターゲットの分子は結合しない。そこで、結合していないターゲットの分子を洗浄して除去することで、結合したターゲットの分子のみをマイクロアレイ上に残存させる。このターゲットの分子は25 蛍光色素で標識されているため、ターゲットの蛍光を、信号強度として測定し、ハイブリダイズしているプローブを同定する。

蛍光標識された上記ターゲットは、一般的には、比較したい2つの状態（第1

の状態および第2の状態とする)の細胞からmRNAを抽出し、蛍光表示されたヌクレオチドの存在下で逆転写反応を実施することで作製される。このとき、上記2つの状態毎に、異なる検出波長を有する2種類の蛍光色素を用いる。したがって、ターゲット中には、発現量の多い遺伝子のcDNAが多く含まれていることになるので、上記蛍光の信号強度は、各状態における遺伝子の発現量に応じたものとなる。それゆえ、上記信号強度を測定すれば、特定の遺伝子の発現量を検出することが可能になる。

次に、上記DNAマクロアレイは、基本的には、DNAマイクロアレイと同様の構成を有しているが、支持体としてナイロンメンブレン等の一般的なメンブレンフィルターが用いられる点が異なっている。マクロアレイの利点としては、公知のプロット法に準じた方法で、ゲノムワイドで発現プロファイル解析を実施することができることや、スポットしたDNAをアルカリ変性処理してメンブレンフィルターに固定するため、マイクロアレイのようにハイブリダイゼーション中や洗浄中にDNAが剥離することがないこと等が挙げられる。それゆえ、マクロアレイとマイクロアレイとは、用途に応じて使い分けることが可能である。

上記マクロアレイの使用法の一例について説明する。マクロアレイの使用法は基本的に前記マイクロアレイと同様である。具体的には、まず、マクロアレイに、 $^{33}\text{P}$ 等のアイソトープで標的したターゲットをハイブリダイズさせる。そして、結合していないターゲットの分子を洗浄して除去し、結合したターゲットの分子のみをマクロアレイ上に残存させる。ここで、結合しているターゲットの分子は上記アイソトープで標識されているため、マイクロアレイとは異なり、スポットをイメージングプレートへ露光させ、このイメージングプレートからターゲットの発現量を信号強度として測定する。

他に、本発明で用いることができる核酸アレイとしては、マスアレイが挙げられる。マスアレイは、シリコン製の基板上にゲノムDNA断片を規則的に配列させて固定化したものであり、基本的に、上記DNAマイクロアレイと同様の構成を有している。このマスアレイはSNP解析のために開発されたものであり、その使用法は、DNAマイクロアレイとは異なっている。

すなわち、マスアレイに標的のSNPの近傍に相当するオリゴヌクレオチドを

合成してハイブリダイズさせる。これをプライマーとしてDNAポリメラーゼにより伸長させるとSNPに対応する1塩基のみが異なるDNA断片が生合成される。これを溶出しMALDIによってイオン化した後、TOS-MSにより塩基1個分の質量の違いを検出すればSNPの型を決定することができる。

5       また、本発明で用いることができる他の核酸アレイとしては、ビーズアレイを挙げることができる。このビーズアレイは、小容器内で識別コードを付与したビーズの表面に核酸や抗体等のプローブを固定し、このビーズの識別コードを読み取ることで表面に固定されているプローブを特定するもので、2波長のレーザー光を用いれば100種類のビーズに対する定量が可能となる。このように、本発明にかかるアレイは、上記支持体が、個々の生体物質または合成物質を固定化する小支持体（上記の場合、ビーズ）の集団からなっているいてもよい。

#### ＜染色体座位確認可能アレイ＞

ここで、本発明において最も好ましく用いられる核酸アレイとしては、前記実施の形態1等で説明した染色体座位確認可能アレイであることが好ましい。すな  
15       わち、この染色体座位確認可能アレイは、固定化されているプローブ（複数の核酸分子）が、個々の核酸分子に対応するそれぞれの塩基配列のブロックが染色体上に並んでいる順序を確認できるように、配列されている構成を有している。最も典型的な染色体座位確認可能アレイとしては、それぞれの核酸分子（プローブ）の配列の順序が、当該プローブの塩基配列に対応する塩基配列のブロックが染  
20       色体上に並んでいる順序となっている、すなわち、各プローブが染色体順に配列している構成を挙げることができる。このようにプローブが染色体順に配列している染色体座位確認可能アレイとしての核酸アレイは、上記マイクロアレイやマクロアレイ、マスアレイ等に適用される。

一方、上記ビーズアレイの場合は、固定化されているプローブを固定化してい  
25       るビーズに、各プローブの塩基配列に対応する塩基配列のブロックが染色体上に並んでいる順序に対応する配列位置情報を付与しておけばよい。これにより、使用時には、分析結果（ハイブリダイゼーション結果）の取得とともに、これら配列位置情報を読み取って、上記分析結果の配列の順序を染色体上に並んでいる順序に並べ変えることができる。

上記核酸アレイに固定化される核酸分子は、DNAであってもRNAであってもよいが、一般的には、上述したようにDNAが用いられる。DNAアレイ（核酸アレイ）に固定化されるプローブとしてのDNAは特に限定されるものではないが、遺伝マーカー、ゲノムDNA、制限酵素処理したゲノムDNA、cDNA、EST、または合成オリゴDNA等が好ましく用いられる。これらDNAは、  
5 遺伝地図または物理地図を基準として配列されていることが好ましい。例えば、上記遺伝マーカーを複数種類用いて遺伝マーカー群としたときに、これが遺伝地図を構成するようになっていないと好ましい。これによって、遺伝地図を基準として上記DNA断片を基板上に配列させることができる。

10 上記遺伝マーカーおよび遺伝マーカー群としては、染色体上で遺伝的な標識として用いることができるものであれば特に限定されないが、具体的には特に限定されるものではなく、例えば、上記ESTを用いたESTマーカー、一塩基多型（SNP、Single Nucleotide Polymorphism）を含むSNPマーカー、制限酵素断片長多型（RFLP、Restriction Fragment Length Polymorphism）マ  
15 ーカーやマイクロサテライトマーカー（SSR（Simple Sequence Repeat）マーカー）を挙げることができる。したがって、上記遺伝マーカー（群）には、マーカーとして用いることのできる制限酵素処理したゲノムDNA、EST、または合成オリゴDNA等も含まれる。

20 支持体上に固定化されるDNA（プローブ）の数（種類）は特に限定されるものではないが、通常、数千個（ $10^3$ ）レベルであればよい。この固定化の数（配列される数）は、スポッター等アレイの製造に用いられる装置の種類や、支持体（基板）の面積等により大きく変動する。

25 なお、DNAアレイでは、固定化されたDNA（プローブ）に対応する遺伝子以外の遺伝子の発現に関する情報を得ることができない。そのため、より体系的・網羅的な遺伝子発現解析を試みる場合には、固定化されるDNA（プローブ）の数をできる限り多くすることが好ましい。

## （II）遺伝子型解析表示システムの構成

### <入力部>

本発明では、所望の生物種において、個体Aと個体Bとの交雑（A×B）に由

来する雑種世代の個体について、核酸アレイにより遺伝子の発現量を分析し、その結果を用いて遺伝子型を解析し表示する。したがって、本発明にかかる遺伝子型解析表示システムは、入力部として、核酸アレイによる遺伝子発現量のハイブリダイズ分析の結果、すなわち、解析対象となる雑種個体の網羅的な遺伝子の発現量情報を入力可能とする手段を備えていればよい。

図7に示す構成では、スキャナ21から核酸アレイの分析結果を画像情報として入力し、画像情報処理部11で当該画像情報を解析して分析結果から遺伝子の発現量情報を生成する。このスキャナ21としては特に限定されるものではなく、核酸アレイを用いたハイブリダイゼーションの結果を画像情報として読み取ることが可能な画像読取手段であればよい。より具体的には、核酸アレイから、プローブにハイブリダイズしたターゲットの蛍光を、信号強度という画像データとして読み取ることで、遺伝子の発現量を検出する。したがって、上記スキャナ21としては、公知の蛍光スキャナ21等を好適に用いることができる。

ここで、スキャナ21から得られる画像情報は、必要な情報処理を行うことにより、遺伝子の発現量情報として生成される。したがって、本発明では、図7に示すように、得られた画像情報から遺伝子の発現量を解析し、網羅的な遺伝子の発現量情報を生成する画像情報処理部11を備えていることが好ましい。画像情報処理部11の具体的な構成は、特に限定されるものではなく、公知の遺伝子発現解析システムを用いることができる。

また、本発明では、後述するように、上記核酸アレイから得られるハイブリダイズ分析の結果（雑種個体の網羅的な遺伝子の発現量情報）を、当該雑種個体の両親の遺伝情報、および、これら個体の属する生物種の遺伝地図と比較する。したがって、本発明にかかる遺伝子型解析表示システムは、上記スキャナ21（画像読取手段）に加えて、両親の遺伝情報および遺伝地図の情報を入力可能とする手段を備えていればよい。

まず、両親の遺伝情報を入力する手段としては、特に限定されるものではないが、図7に示す構成では、外部通信部22、記録媒体読書部23、手動入力部24等がこれに相当する。基本的に、親世代の個体については、各種遺伝情報が十分知られているので、例えば、外部通信部22により、ネットワークを介してデ

データベースから両親の遺伝情報を入手してもよいし、各種記録媒体に記録されている両親の遺伝情報を記録媒体読書部23から読み取ってもよいし、手入力可能な情報であれば手動入力部24で入力してもよい。

外部通信部22は、外部の装置との間で情報の入出力を可能とする構成であれば特に限定されるものではなく、公知のLANカード、LANボード、LANアダプタや、モデム等の公知の通信用インターフェースを用いればよい。また、記録媒体読書部23の具体的な構成も特に限定されるものではなく、例えば、ハードディスクドライブ、フレキシブルディスクドライブ、CD-ROMドライブ、DVD-ROMドライブ等の公知のディスクドライブや、各種メモリカード、USBメモリ等のメモリカートリッジ等を好適に用いることができる。手動入力部24の具体的な構成も特に限定されるものではなく、キーボードやタブレット等、従来公知の入力手段を好適に用いることができる。

ここで、上記両親の遺伝情報としては、具体的には、特に限定されるものではないが、両親の遺伝子型、遺伝子発現プロファイル情報等を挙げることができる。このうち、比較的公知になっている可能性の高い情報は、両親の遺伝子型情報である。特に、実験用の生物や、農作物あるいは家畜等として重要な生物種については、その遺伝子型は広く公表されており、データベース化されているものもあるので、両親の遺伝情報としては、遺伝子型情報を好適に用いることができる。

また、遺伝子発現プロファイル情報は、細胞内での遺伝子発現を網羅的に解析して得られる情報であり、一般的な条件または特定の条件下では、個体の遺伝子型によって遺伝子発現のパターンが異なる場合がある。それゆえ、この遺伝子発現プロファイル情報は、上記遺伝子型情報に代えて、両親の遺伝情報として用いることもできるし、上記遺伝子型情報とともに用いて、両親の遺伝情報をより補強することも可能である。

次に、遺伝地図の情報を入力する手段としても特に限定されるものではなく、上述した両親の遺伝情報を入力する手段と同一の手段を用いることができる。これは、遺伝地図は両親の遺伝情報と同じく、染色体地図としてすでに完成されているものが比較的多いためである。しかしながら、大部分の農作物や家畜動物等

については、十分な遺伝地図が作成されていないことも多い。そこで、本発明では、例えば、図7に示すように、遺伝地図作成情報に基づいて必要な遺伝地図を作成する遺伝地図作成部12が設けられていてもよい。この遺伝地図作成部12については、後に詳述する。

5       なお、上記雑種個体の網羅的な遺伝子の発現量情報は、スキャナ21・画像情報処理部11を介さないで入力されてもよい。例えば、すでに、スキャナ21および他の遺伝子発現解析システムで入力および解析された遺伝子の発現量情報を、外部通信部22や記録媒体読書部23から入力してもよい。

10       さらに、本発明にかかる遺伝子型解析表示システムでは、上記雑種個体の網羅的な遺伝子の発現量情報、両親の遺伝情報、および遺伝地図作成情報の少なくとも何れかを修正可能とする手段も設けられていることが好ましい。具体的には、図7に示す構成では、上記手動入力部24がこれに相当する。

15       後述するように、本発明にかかる遺伝子型解析表示システムでは、その解析過程において、遺伝地図作成時や、表示用情報生成時には、一度入力ミスがあるか否かを確認するステップを行う。これにより最終的に得られる表示用情報の信頼性を高めることができる。それゆえ、この入力ミスを補正するための手段が備えられていることが好ましく、具体的には、手動入力部24を挙げることができる。もちろん、補正するための手段は手動入力部24に限定されるものではなく、他の手段であってもよい。

#### 20       <解析部>

      本発明では、所望の生物種において、個体Aと個体Bとの交雑(A×B)に由来する雑種世代の個体について、核酸アレイにより遺伝子の発現量を分析し、その結果を用いて遺伝子型を解析し表示する。それゆえ、上記入力部から入力された情報を解析する解析部10が必須構成として含まれる。解析部10としては、  
25       図7に示すように、少なくとも、遺伝子型由来判別部13および表示用情報生成部14が設けられていればよい。

      上記遺伝子型由来判別部13は、上記スキャナ21から読み込まれ、画像情報処理部11で生成された遺伝子の発現量情報および多型情報、あるいは、外部通信部22や記録媒体読書部23等から入力された遺伝子の発現量情報を、上記両親



親の遺伝情報、および、上記遺伝地図と比較し、任意の雑種個体の遺伝子型が何れの両親に由来するかを判別する。このとき、遺伝子型由来判別部13による判別の種類は、交雑の過程や生物種等に応じて適宜決定されるものであり、特に限定されるものではないが、例えば、任意の遺伝子型を、何れかの両親型、ヘテロ型、または判別不能の何れかに判別し、これを判別結果として生成すればよい。

上記の判別は、両親の遺伝情報（遺伝子型や発現プロファイル情報）と遺伝地図とを利用し、これらと遺伝子の発現量情報および多型情報とを比較することにより行われる。多型情報としては、例えば、SNPやRFLPによる多型を挙げることができる。これら多型情報は、通常、遺伝マーカーとして利用することができるので、換言すれば、上記の判別では、比較対象となる遺伝子型に特有の遺伝マーカーの有無等を基準とすればよい。もちろん、本発明はこれに限定されるものではなく、有効な判別が可能であれば、具体的な比較方法では必ずしも多型情報を利用しなくても構わない。

上記表示用情報生成部14は、遺伝子型由来判別部13から得られる判別結果を複数まとめ、これら判別結果に基づいて、個々の遺伝子型が何れの両親に由来するかを識別可能とするように、染色体ごとに複数の遺伝子型をまとめて表示する。このとき生成される表示用情報としては、染色体ごとに各遺伝子型の由来が識別可能となっている構成であれば特に限定されるものではないが、例えば、統計量を表示用情報に含めて生成することが好ましい。統計量としては、特に限定されるものではないが、具体的には、染色体別の組換え数、および組換え頻度の少なくとも一方、好ましくは両方を挙げることができる。これら統計量が表示用情報に含まれていれば、個々の遺伝子型の由来だけでなく、雑種個体の染色体別にどのような交叉が生じているのかを包括的に確認することができる。

ここで、上記表示用情報においては、染色体ごとに各遺伝子型の由来が識別可能になっていればよいが、具体的には、例えば、図8に示すように、表示色または表示パターンを変えることにより任意の遺伝子型の由来を識別可能に表示すればよい。図8に示す例では、横線による網掛けパターンの領域が父親（一方の親）型、点による網掛けパターンの領域が母親（他方の親）型、黒で塗りつぶしたパターンの領域がヘテロ型、何も表示パターンが示されていない空白の領域が由来

不明となっているが、このような表示パターンに限定されるものではなく、表示色で分けてもよい。

生物種の個体それぞれについて、その遺伝子型を示した地図を一般的にグラフィカルジェノタイプと称する。これによってすでに形質に連鎖しているマーカーが存在する場合には、その形質（遺伝子座）がその個体に含まれているか否かわかる。したがって、本発明は、核酸アレイによる遺伝子発現量のハイブリダイズ分析の結果から、両親の遺伝子型をグラフィカルジェノタイプで表示する技術とすることができる。それゆえ、本発明で生成される表示用情報においては、グラフィカルジェノタイプで利用されている表示方法を好適に適用することができる。

本発明にかかる遺伝子型解析表示システムにおいては、上記遺伝子型由来判別部 1 3 および表示用情報生成部 1 4 に加えて、前記遺伝地図作成部 1 2 が備えられていてもよい。遺伝地図作成部 1 2 は、遺伝地図作成情報に基づき、上記雑種個体の属する生物種の遺伝地図を作成する。前述したように、生物種によっては遺伝地図が作成されているものもあるが、遺伝地図が作成されていない生物種も多いことから、遺伝地図作成部 1 2 を備えることが好ましい。

遺伝地図作成部 1 2 は、種々の遺伝地図作成情報に基づいて、染色体ごとに遺伝地図を作成するようになっていれば特に限定されるものではない。このとき用いられる遺伝地図作成情報としては、具体的には、例えば、解析対象の生物種で知られている遺伝子および／または遺伝マーカーの名称と、当該遺伝子および／またはマーカーの染色体上の座乗位置とが少なくとも用いられればよい。

なお、上記遺伝地図作成情報を入力するための手段としては、特に限定されるものではなく、上述した各入力部、例えば、図 7 に示す外部通信部 2 2、記録媒体読書部 2 3、手動入力部 2 4 等を用いることができる。

さらに、前述した染色体座位確認可能アレイを用いることで、座乗位置未知の遺伝マーカーをマッピングすることにより遺伝地図を作成することができる。具体的には、まず、染色体座位確認可能アレイに対して、解析対象の生物種のメンデル分離集団から得られるターゲットをそれぞれハイブリダイゼーションして、遺伝地図を作成するとともに、座乗位置が未知の遺伝マーカーを同一の染色体座

位確認可能アレイにハイブリダイゼーションさせることによって、未知の遺伝マーカーの座乗位置を決定することができる。これにより、密度の高い遺伝地図を作成することも可能となる。

また、上記の例では、染色体座位確認可能アレイとして同一のアレイを用いたが、座乗位置未知の遺伝マーカーをマッピングする方法はこれに限定されるものではない。例えば、同じターゲットを異なるアレイ上の遺伝マーカーに処理することでマッピングすることも可能である。このとき、Single Feature Polymorphism (SFP) のように、遺伝子の発現量がメンデル分離すれば、SNPやRFLPによる多型を検出できなくても、当該遺伝子をマッピングすることができる。

したがって、本発明にかかる遺伝子型解析表示システムにおいては、遺伝子型を解析する前段で、遺伝地図作成部12で遺伝地図を作成するために、スキャナ21・画像情報処理部11によりアレイからハイブリダイゼーション結果を読み取って解析処理をしてもよい。それゆえ、図7に示すように、画像情報処理部11からは遺伝地図作成部12に対しても情報を出力（図中の矢印）できるようになっている。

ここで、上記遺伝地図作成部12により作成した遺伝地図や、遺伝子型由来判別部13で生成された判別結果等は、メモリ16に一旦記憶しておくこともできる。図7に示す解析部10に備えられているメモリ16は、本発明にかかる遺伝子型解析表示システムで利用されたり生成されたりする各種情報を記憶する記憶部であり、制御部15により記憶動作が制御されるようになっている。メモリ16の具体的な構成は特に限定されるものではないが、例えば、RAMやROM等の半導体メモリ等を挙げることができる。なお、入力部の一つとして説明した記録媒体読書部23も本発明の記憶部として用いることができる。この点については、次の出力部の項で具体的に説明する。

図7に示す構成の解析部10では、解析部10全体の動作、さらには、遺伝子型解析表示システム全体の動作を制御する制御部15が設けられている。図7に示す構成では、画像情報処理部11、遺伝地図作成部12、遺伝子型由来判別部13、表示用情報生成部14、およびメモリ16の各手段に対して、上記制御部

1 5 から制御情報が出力され、この制御情報に基づいて上記各手段が連携して動作することで、上記遺伝子型解析表示システム全体が動作する。また、制御部 1 5 に対しては、各手段から各種情報も入力可能となっているので、図 7 では、制御情報のやりとりを示す矢印は双方向となっている。

5       <出力部>

本発明では、所望の生物種において、個体 A と個体 B との交雑 ( $A \times B$ ) に由来する雑種世代の個体について、核酸アレイにより遺伝子の発現量を分析し、その結果を用いて遺伝子型を解析し表示する。したがって、本発明にかかる遺伝子型解析表示システムは、出力部として、表示用情報を出力するための手段が備えられていればよい。

上記表示用情報を出力するための出力部としては、特に限定されるものではないが、具体的には、表示用情報を画面上で表示（ソフトコピー）するディスプレイ 2 6、および、表示用情報を印刷（ハードコピー）するプリンタ 2 5 の少なくとも何れか、好ましくは両方を備えていればよい。ディスプレイ 2 6 の具体的な構成は特に限定されるものではなく、公知の CRT ディスプレイや、液晶ディスプレイ、プラズマディスプレイ等といった各種表示装置を好適に用いることができる。また、プリンタ 2 5 の具体的な構成も特に限定されるものではなく、公知のインクジェットプリンタやレーザープリンタ等の画像形成装置を好適に用いることができる。

20       上記ディスプレイ 2 6 もプリンタ 2 5 も何れもカラーで表示用情報を出力することが好ましい。これによって、遺伝子型の由来を様々な表示色により分けることができるので、表示のバリエーションを増やすことができる。さらに、図 8 に示すような表示パターンで遺伝子型の由来を分ける場合でも、カラーで表示することでより分かりやすい表示を可能とすることができるため好ましい。

25       上記出力部としては、上記ディスプレイ 2 6 およびプリンタ 2 5 に限定されるものではなく、他の手段を用いることもできる。具体的には、まず、前述した外部通信部 2 2 も出力部として好適に用いることができる。つまり、上記外部通信部 2 2 は、外部の装置との間で情報の入出力を可能とするものであり、入力部と出力部とを兼ねた構成となっている。これにより、外部のネットワーク等を介し

て、他の装置に表示用情報を送信することが可能となるので、本発明にかかる遺伝子型解析表示システムをより効率的に使用することができる。

具体的には、例えば、LANを介して遺伝子型解析表示システムが外部の装置とつながっている場合には、例えば研究施設等に一つの遺伝子型解析表示システムを設けるのみで、他の研究者はパーソナルコンピュータ等の情報端末を介して当該遺伝子型解析表示システムを共用することができる。さらに、上記遺伝子型解析表示システムの解析結果を、通信ネットワークを介して外部のサーバに蓄積していくこともできる。その結果、解析結果をより一層有効利用することが可能となる。

上記出力部としては、入力部の一つとして説明した記録媒体読書部23も好適に用いることができる。すなわち、本発明にかかる遺伝子型解析表示システムにおいては、記録媒体から情報を読み取るだけでなく、書き込みもできるドライブを備えていれば、これを出力部として利用することができる。記録媒体読書部23の具体的な構成は特に限定されるものではなく、前記入力部で説明したように、ハードディスクドライブ、フレキシブルディスクドライブ、CD-ROMドライブ、DVD-ROMドライブ等の公知のディスクドライブや、各種メモリカード、USBメモリ等のメモリカートリッジ等を好適に用いることができる。

なお、図7に示す構成では、画像情報処理部11、遺伝地図作成部12、遺伝子型由来判別部13、表示用情報生成部14、制御部15、およびメモリ16で解析部10を構成し、それ以外の入力部・出力部は個別に独立した状態で一つのシステムが構築されている例を挙げているが、もちろん本発明はこれに限定されるものではなく、全ての手段が一つの装置になっている構成であってもよいし、一部の入力部および／または出力部が解析部10と一体化している構成であってもよいし、図7で挙げている以外の手段を含む構成であってもよい。

上記解析部10の具体的な構成は特に限定されるものではなく、従来公知の演算手段、具体的には、コンピュータの中央処理装置(CPU)等であり、その動作はコンピュータプログラムにしたがって実行される構成であればよい。

### (III) 遺伝子型解析表示システムによる解析方法

本発明にかかる遺伝子型解析表示システムで行われる具体的な解析方法は特に

限定されるものではないが、具体的には、例えば、図8に示すような12ステップの構成を挙げることができる。

まず、ステップ101（以下、適宜ステップをSと略す）では、各入力部により遺伝地図作成情報（染色体、重要遺伝子や遺伝マーカーの名称、座乗位置等）を入力する。次に、S102では、上記遺伝地図作成部12で上記遺伝地図作成情報に基づき遺伝地図を作成し、遺伝子型由来判別部13に出力する。このとき、遺伝地図をメモリ16に記憶させてもよいし、必要に応じてディスプレイ26に中間表示させてもよい。その後、S103で入力ミスがあるか否か、すなわち補正すべきか否かを確認する。ミスがあれば（図中YES）S104で手動入力部24等により遺伝地図作成情報を入力し直し、S101に戻る。

次に、補正する必要がなければ（図中NO）S105に進む。S105では、両親の遺伝情報（両親の遺伝子型および／または遺伝子発現プロファイル情報）を入力部から入力する。さらに、S106で、スキャナ21・画像情報処理部11から解析対象となる雑種個体（図9では対象個体）の遺伝子の発現量情報（すなわちDNAアレイ解析結果）を入力する。そして、S107で、遺伝子型由来判別部13にて、雑種個体の網羅的な遺伝子の発現量情報を、当該雑種個体の両親の遺伝情報、および、これら個体の属する生物種の遺伝地図と比較し、任意の雑種個体の遺伝子型が何れの両親に由来するかを判別する。その後、S108で必要な遺伝子型を全て判別したか否かを確認する。判別できていなければ（図中NO）、S107に戻って判別を繰り返す。

一方、S108で全ての遺伝子型の判別が終了していれば、S109では、表示用情報生成部14により、判別結果を複数まとめ、これら判別結果に基づいて、個々の遺伝子型が何れの両親に由来するかを識別可能とするように、染色体ごとに複数の遺伝子型をまとめて表示するための表示用情報を生成する。このとき、表示用情報をメモリ16に記憶させてもよいし、必要に応じてディスプレイ26に中間表示させてもよい。その後、S110で生成ミスがあるか否か、すなわち補正すべきか否かを確認する。ミスがあれば（図中YES）S111で手動入力部24により補正情報を入力し、S107に戻る。一方、補正する必要がなければ（図中NO）S112において、最終的な表示用情報を出力部から出力する

。これにより一連の解析過程が終了する。

#### (IV) 本発明の利用

本発明にかかる遺伝子型解析表示システムの利用方法は特に限定されるものではなく、任意の生物種において、個体Aと個体Bとの交雑（ $A \times B$ ）に由来する  
5 雑種個体について、核酸アレイによるハイブリダイゼーション結果を用いて解析を行い、当該雑種個体の染色体上のどの位置で交叉が起こっているかを視覚的に表示する用途であればよい。

具体的な利用の一例としては、例えば、生物を交雑して得られる雑種から目的の形質を含む染色体断片を同定する（遺伝子型を同定する）用途や、品種改良し  
10 ようとする生物を交雑して得られる雑種から目的の形質を保持する品種を選抜する用途に好適に用いることができる。本発明では、染色体上のどの部分が組み換わっているか否かを容易に確認することができるので、その結果、交雑により得られた分離集団の中から、目的とする形質を有する個体のみを正確に選抜することが  
15 できる。しかも、本発明を用いれば、雑種世代における染色体の組み換えのデータを蓄積していくことができるので、組み換えを容易に推定することが可能となり、遺伝子群のブロック単位の導入あるいはブロック内の遺伝子の改変が可能となる。

本発明にかかる遺伝子型の同定方法や選抜方法を利用できる生物としては、特に限定されるものではなく、植物、動物または微生物の何れであってもよい。特  
20 に、染色体を有しメンデル遺伝する生物であれば、本発明の利用対象とすることができる。メンデル遺伝する生物としては、特に限定されるものではないが、商業的に利用され品種改良の要求の高い生物を挙げることができる。

このような生物としては、植物として、各種作物（農林水産業で生産される植物、農作物）を挙げる  
25 ことができる。具体的には、例えば、イネ、コムギ、オオムギ、ライムギ、ライコムギ、トウモロコシ等のイネ科植物；ノリ等の海藻類；各種野菜・花卉類；スギ、ヒノキ等の材木類；等を挙げる  
ことができる。また動物としては、各種家畜動物を挙げる  
ことができる。具体的には、ウシ、ヒツジ、ブタ等の家畜哺乳類；ニワトリ、ウズラ等の家畜鳥類；ハマチ、タイ、コイ、アユ等の魚類；ミツバチ、カイコなどの家畜昆虫類；カキ、アワビ、ホタテガイ等

の貝類；等を挙げることができる。さらに微生物としては、大腸菌等の細菌類、酵母、糸状菌、放線菌、担子菌等を挙げることができる。

上記の中でも、イネ科植物には、イネ、コムギ、トウモロコシまたはオオムギ等、国際的に広く栽培されている穀物が含まれており、重要な戦略作物であるものが多い。それゆえ、これらイネ科植物の品種改良に本発明を適用すれば、優れた形質を有する品種を効率的に得ることができる。

また、本発明を利用できる生物には、実験用に用いられる動植物（実験動物・実験植物）等も含まれる。実験動物としては、具体的には、例えば、マウス、ラット、ショウジョウバエ、線虫等を挙げることができる。また、実験植物としては、具体的には、例えば、シロイヌナズナ等を挙げることができる。なお、本発明においては、本発明を利用して遺伝子型を同定する場合には、上記生物がヒトであってもよい。

なお、本発明は、上述した実施の形態の記載に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、当業者は本発明の範囲を逸脱することなく、種々の変更、修正、および改変を行うことができることはいうまでもない。

以上のように、本発明にかかる遺伝子型解析表示システムは、雑種個体の網羅的な遺伝子の発現量情報を、当該雑種個体の両親の遺伝情報、および、これら個体の属する生物種の遺伝地図と比較し、任意の雑種個体の遺伝子型についてその由来を判別し、表示する。そのため、雑種個体の染色体において、どの位置で交叉が起こっているかを視覚的に表示することが可能となる。それゆえ、雑種世代の各個体から核酸を取得し、核酸アレイによるハイブリダイゼーション結果を得るのみで、当該個体の遺伝子型を明確に判定または確認することができる。

その結果、本発明を用いれば、雑種世代の各個体について任意の遺伝子型およびそれによってもたらされる形質が遺伝されているか否かを容易かつ明確に判断することが可能となるので、膨大に得られる雑種世代から目的の形質を発現する個体を容易、確実かつ再現性良く選抜することが可能になる。それゆえ、核酸アレイを用いて得られる遺伝子発現データを交雑育種による品種改良に有効に利用することができるという効果を奏する。



## 〔実施の形態5〕

本発明にかかる量的遺伝子座解析システムの一実施形態について図10および図11に基づいて説明すると以下の通りである。なお、本発明はこれに限定されるものではない。

5 本発明にかかる量的遺伝子座解析システムは、F2、戻し交雑集団、倍加半数体（ダブルドハプロイド）集団などのメンデル分離集団において、集団の各雑種個体の表現型（病気の抵抗性が何ポイント等）の値を調査するとともに、各雑種個体から抽出した核酸試料を核酸アレイにハイブリダイズすることで、アレイ上のスポットを実質的に遺伝マーカーとして用い、量的遺伝子座を解析するシステムである。

10 本発明にかかる量的遺伝子座解析システムの具体的な構成は特に限定されるものではないが、具体的には、例えば、図10に示すように、画像情報処理部（画像情報処理手段）31、遺伝地図作成部（遺伝地図作成手段）32、遺伝マーカー特定部（遺伝マーカー特定手段）33、量的遺伝子座決定部（量的遺伝子座決定手段）34、制御部（制御手段）35、メモリ（記憶手段）36、スキャナ（画像読取手段、入力手段）21、外部通信部（外部情報入出力手段）22、記録媒体読書部（記憶手段、入力手段、出力手段）23、手動入力部（手動入力手段）24、プリンタ（画像形成手段、印刷手段、出力手段）25、ディスプレイ（画像表示手段、出力手段）26等を備えている構成を挙げることができる。上記構成の量的遺伝子座解析システムは、入力部、出力部、解析部（解析手段）30に大別することができる。

## （I）核酸アレイ

25 本発明では、所望の生物種において、メンデル分離集団ごとに得られる雑種個体からゲノム試料を調製し、これを核酸アレイにハイブリダイズさせることで当該雑種個体について網羅的な遺伝子の存在情報を取得する。ここで、本発明で用いられる核酸アレイとしては、特に限定されるものではなく、公知の核酸アレイを好適に用いることができる。具体的には、例えば、マイクロアレイ、マクロアレイ、ビーズアレイ等を挙げることができる。本実施の形態では、上記核酸としてDNAを用いているので、より具体的な例としては、DNAマイクロアレイや

DNAマクロアレイ等のDNAアレイを挙げることができる。

上記DNAマイクロアレイやDNAマクロアレイ、あるいは、その他のDNAアレイについては、前記実施の形態4にて詳細に説明しているので、本実施の形態では、その説明を省略する。ここで、本実施の形態でも、前述した染色体座位  
5 確認可能アレイを用いることが好ましい。

上記DNAアレイの使用方法について、DNAマイクロアレイを例に挙げて説明すると、まず、DNAマイクロアレイに、蛍光色素で標的したターゲットDNA（以下、ターゲットと略す）をハイブリダイズさせる。このとき、DNAマイクロアレイ上で、プローブと相補的な配列を含むターゲットの分子は、上記プロ  
10 ーブの分子と相補的に結合（ハイブリダイズ）するが、それ以外のターゲットの分子は結合しない。そこで、結合していないターゲットの分子を洗浄して除去することで、結合したターゲットの分子のみをマイクロアレイ上に残存させる。このターゲットの分子は蛍光色素で標識されているため、ターゲットの蛍光を、信号強度として測定し、ハイブリダイズしているプローブを同定する。

本発明では、雑種個体の網羅的な遺伝子の存在情報を取得するため、ハイブリ  
15 ダイズの有無の確認により、個々の遺伝子の存在を確認することができる。すなわち、個体から取得したゲノムDNAを制限酵素処理する等して断片化し、これをターゲットとしてDNAアレイにハイブリダイズさせることで、DNAアレイ上に存在するプローブと相補的な塩基配列が存在するか否かを確認することがで  
20 きる。これにより得られる情報を網羅的な遺伝子の存在情報とする。

上記核酸アレイに固定化される核酸分子は、DNAであってもRNAであってもよいが、一般的には、上述したようにDNAが用いられる。DNAアレイ（核酸アレイ）に固定化されるプローブとしてのDNAは特に限定されるものではないが、本発明では、遺伝マーカー（群）が用いられる。これら遺伝マーカー（群  
25 ）は、遺伝地図または物理地図を基準として配列させればよい。

上記遺伝マーカー（群）としては、染色体上で遺伝的な標識として用いることができるものであれば特に限定されないが、具体的には特に限定されるものではなく、例えば、前述した、ESTマーカー、SNPマーカー、RFLPマーカーやマイクロサテライトマーカー（SSRマーカー）を挙げることができる。本発

明は、これらの中でも多型を有するSNPマーカーやRFLPマーカーを好ましく用いることができる。

## (II) 量的遺伝子座解析システムの構成

### <入力部>

5       本発明では、任意の生物種の遺伝マーカーを固定化した核酸アレイに対して、集団系統ごとに得られる雑種個体から得られるゲノム試料をハイブリダイズさせる。これにより、雑種個体の網羅的な遺伝子の存在情報を取得し、これを用いて集団系統別に遺伝マーカーを特定し、QTL解析を行う。したがって、本発明にかか

10       る量的遺伝子座解析システムは、入力部として、遺伝マーカーを特定するための網羅的な遺伝子の存在情報を入力可能とする手段を備えていればよい。

      図10に示す構成では、スキャナ21から核酸アレイの分析結果を画像情報として入力し、画像情報処理部31で当該画像情報を解析して分析結果から遺伝子の存在情報を生成する。このスキャナ21としては特に限定されるものではなく、核酸アレイを用いたハイブリダイゼーションの結果を画像情報として読み取る

15       ことを可能とする画像読取手段であればよい。より具体的には、核酸アレイから、プローブにハイブリダイズしたターゲットの蛍光を、信号強度という画像データとして読み取ることで、遺伝子の発現量を検出する。したがって、上記スキャナ21としては、公知の蛍光スキャナ21等を好適に用いることができる。

      ここで、スキャナ21から得られる画像情報は、必要な情報処理を行うことにより、遺伝子の存在情報として生成される。したがって、本発明では、図10に示すように、得られた画像情報を解析し、網羅的な遺伝子の存在情報を生成する画像情報処理部31を備えていることが好ましい。画像情報処理部31の具体的な構成は、特に限定されるものではなく、公知の解析システムを用いることができる。

20

25       また、本発明では、後述するように、上記核酸アレイから得られるハイブリダイズ分析の結果（雑種個体の網羅的な遺伝子の存在情報）を、当該雑種個体の遺伝マーカー情報、および、これら個体の属する生物種の遺伝地図と比較する。したがって、本発明にかか

      る量的遺伝子座解析システムは、上記スキャナ21（画像読取手段）に加えて、遺伝マーカー情報、および、任意の表現型を数値化した

表現型値の少なくとも一方を入力可能とする手段を備えており、さらに、遺伝地図および遺伝地図作成情報の少なくとも一方を入力可能とする手段を備えていればよい。

まず、遺伝マーカー情報または表現型値を入力する手段としては、特に限定されるものではないが、図10に示す構成では、外部通信部22、記録媒体読書部23、手動入力部24等がこれに相当する。また、上記遺伝地図または遺伝地図作成情報を入力する手段としても、これら各入力手段が用いられる。

外部通信部22は、外部の装置との間で情報の入出力を可能とする構成であれば特に限定されるものではなく、公知のLANカード、LANボード、LANアダプタや、モデム等の公知の通信用インターフェースを用いればよい。また、記録媒体読書部23の具体的な構成も特に限定されるものではなく、例えば、ハードディスクドライブ、フレキシブルディスクドライブ、CD-ROMドライブ、DVD-ROMドライブ等の公知のディスクドライブや、各種メモ리카ード、USBメモリ等のメモ리카ートリッジ等を好適に用いることができる。手動入力部24の具体的な構成も特に限定されるものではなく、キーボードやタブレット等、従来公知の入力手段を好適に用いることができる。

上記遺伝マーカー情報としては、核酸アレイに固定化されている位置情報を挙げることができる。すなわち、相補的な塩基配列を有する核酸分子が存在すれば、ハイブリダイゼーションによりスポットが検出されるので、核酸アレイのどの位置に固定化されているスポットがどの遺伝マーカーに相当するかが明らかとなれば、遺伝マーカー情報として利用することができる。

上記表現型値は、任意の表現型を数値化したものであれば特に限定されるものではない。例えば、本発明者らは、オオムギの赤カビ病抵抗性について、「切り穂検定法」を改変した0（抵抗性）～10（罹病性）のスコアで評価している（武田和義、部田英雄、1989、「オオムギにおける赤かび病検定法の開発と耐病性品種の検索」育種学雑誌39参照）。したがって、解析対象となる生物種および注目する形質によってこのような表現型値を利用すればよい。

上記遺伝地図は、実験動物や一部の農作物・家畜動物等では染色体地図としてすでに完成されているものが比較的多いが、大部分の農作物や家畜動物等につい

ては、十分な遺伝地図が作成されていないことも多い。したがって、遺伝地図がすでに作成されている場合には、それを入力すればよいし、遺伝地図が作成されていない場合には、遺伝地図作成情報を入力し、図10に示す遺伝地図作成部32により新たに遺伝地図を作成すればよい。なお、遺伝地図作成部32については、後に詳述する。

さらに、本発明にかかる量的遺伝子座解析システムでは、上記雑種個体の網羅的な遺伝子の存在情報、遺伝マーカー情報、および遺伝地図作成情報の少なくとも何れかを修正可能とする手段も設けられていることが好ましい。具体的には、図10に示す構成では、上記手動入力部24がこれに相当する。

後述するように、本発明にかかる量的遺伝子座解析システムでは、その解析過程において、特に、遺伝マーカー特定時には、一度入力ミスがあるか否かを確認するステップを行う。これにより最終的に得られる後段のインターバルマッピングの信頼性を高めることができる。それゆえ、この入力ミスを補正するための手段が備えられていることが好ましく、具体的には、手動入力部24を挙げることができる。もちろん、補正するための手段は手動入力部24に限定されるものではなく、他の手段であってもよい。

#### <解析部>

本発明では、任意の生物種の遺伝マーカーを固定化した核酸アレイに対して、集団系統ごとに得られる雑種個体から得られるゲノム試料をハイブリダイズさせる。これにより、雑種個体の網羅的な遺伝子の存在情報を取得し、これを用いて集団系統別に遺伝マーカーを特定し、QTL解析を行う。したがって、上記入力部から入力された情報を解析する解析部30が必須構成として含まれる。解析部30としては、図10に示すように、少なくとも、遺伝マーカー特定部33および量的遺伝子座決定部34が設けられていればよい。

上記遺伝マーカー特定部33は、上記スキャナ21から読み込まれ、画像情報処理部31で生成された遺伝子の存在情報を、上記遺伝地図および遺伝マーカー情報と照合し、集団系統ごとに存在する遺伝マーカーを特定する。具体的には、前述したように、核酸アレイに固定化されている遺伝マーカーの位置情報と、遺伝地図との照合から、任意の雑種個体に当該遺伝マーカーが含まれているか否か

を判定し、含まれていることが分かれば、その遺伝マーカーを、当該雑種個体の属する集団系統の遺伝マーカーとして特定する。

ここで、上記雑種個体の遺伝子の存在情報を取得する場合に、核酸アレイとして、上述した染色体座位確認可能アレイを用いれば、固定化されている位置の順序を遺伝マーカー情報として用いることができる。換言すれば、核酸アレイに固定化されているスポットの順番および染色体の地図距離（cM）等を遺伝マーカー情報として利用することも可能である。そのため、遺伝マーカー特定部33における照合処理をより容易化することができるため、非常に好ましい。また、このとき用いられる遺伝マーカー情報は、上述したように、多型を有する遺伝マーカー（SNPまたはRFLP）であれば、各集団系統に典型的な遺伝マーカーとして容易に識別が可能になるため、好ましい。

上記量的遺伝子座決定部34は、同一の雑種個体における任意の表現型を数値化した表現型値が、特定された上記遺伝マーカーと連鎖しているか否かを確認することにより、当該表現型の量的遺伝子座を決定する。量的遺伝子座の決定は、インターバルマッピングにより行えばよい。インターバルマッピングの方法としては、特に限定されるものではないが、具体的には、例えば、Simple Interval Mapping（SIM）、Composite Interval Mapping（CIM）等を用いることができる。また、インターバルマッピングの具体的な解析には、公知の解析システムを用いることができる。具体的には、例えば、MAPMAKER/QTLやQTL Cartographer等の解析用ソフトウェアを使用した解析システムを挙げることができる。

本発明にかかる量的遺伝子座解析システムにおいては、上記遺伝マーカー特定部33および量的遺伝子座決定部34に加えて、前記遺伝地図作成部32が備えられていてもよい。遺伝地図作成部32は、遺伝地図作成情報に基づき、上記雑種個体の属する生物種の遺伝地図を作成する。前述したように、生物種によっては遺伝地図が作成されているものもあるが、遺伝地図が作成されていない生物種も多いことから、遺伝地図作成部32を備えることが好ましい。

遺伝地図作成部32は、種々の遺伝地図作成情報に基づいて、染色体ごとに遺伝地図を作成するようになっていれば特に限定されるものではない。このとき用

いられる遺伝地図作成情報としては、具体的には、例えば、解析対象の生物種で知られている遺伝子および／または遺伝マーカーの名称と、当該遺伝子および／またはマーカーの染色体上の座乗位置とが少なくとも用いられればよい。

5       なお、上記遺伝地図作成情報を入力するための手段としては、特に限定されるものではなく、上述した各入力部、例えば、図10に示す外部通信部22、記録媒体読書部23、手動入力部24等を用いることができる。

0       さらに、前述した染色体座位確認可能アレイを用いることで、座乗位置未知の遺伝マーカーをマッピングすることにより遺伝地図を作成することができる。具体的には、まず、染色体座位確認可能アレイに対して、解析対象の生物種のメンデル分離集団から得られるターゲットをそれぞれハイブリダイゼーションして、  
15       遺伝地図を作成するとともに、座乗位置が未知の遺伝マーカーを同一の染色体座位確認可能アレイにハイブリダイゼーションさせることによって、未知の遺伝マーカーの座乗位置を決定することができる。これにより、密度の高い遺伝地図を作成することも可能となる。

15       また、上記の例では、染色体座位確認可能アレイとして同一のアレイを用いたが、座乗位置道の遺伝マーカーをマッピングする方法はこれに限定されるものではない。例えば、同じターゲットを異なるアレイ上の遺伝マーカーに処理することでマッピングすることも可能である。このとき、Single Feature Polymorphism (SFP) のように、遺伝子の発現量がメンデル分離すれば、SNPやRFLPによる多型を検出できなくても、当該遺伝子をマッピングすることができる。  
20       。

25       したがって、本発明にかかる量的遺伝子座解析システムにおいては、遺伝マーカーを特定する前段で、遺伝地図作成部32で遺伝地図を作成するために、スキャナ21・画像情報処理部31によりアレイからハイブリダイゼーション結果を読み取って解析処理をしてもよい。それゆえ、図10に示すように、画像情報処理部31からは遺伝地図作成部32に対しても情報を出力(図中の矢印)できるようになっている。

ここで、上記遺伝地図作成部32により作成した遺伝地図や、遺伝マーカー特定部33で特定された遺伝マーカーに関する情報、量的遺伝子座決定部34で決

定された量的遺伝子座に関する情報等は、メモリ 36 に一旦記憶しておくこともできる。図 10 に示す解析部 30 に備えられているメモリ 36 は、本発明にかかる量的遺伝子座解析システムで利用されたり生成されたりする各種情報を記憶する記憶部であり、制御部 35 により記憶動作が制御されるようになっている。メモリ 36 の具体的な構成は特に限定されるものではないが、例えば、RAM や ROM 等の半導体メモリ等を挙げることができる。なお、入力部の一つとして説明した記録媒体読書部 23 も本発明の記憶部として用いることができる。この点については、次の出力部の項で具体的に説明する。

図 10 に示す構成の解析部 30 では、解析部 30 全体の動作、さらには、量的遺伝子座解析システム全体の動作を制御する制御部 35 が設けられている。図 10 に示す構成では、画像情報処理部 31、遺伝地図作成部 32、遺伝マーカー特定部 33、量的遺伝子座決定部 34、およびメモリ 36 の各手段に対して、上記制御部 35 から制御情報が出力され、この制御情報に基づいて上記各手段が連携して動作することで、上記量的遺伝子座解析システム全体が動作する。また、制御部 35 に対しては、各手段から各種情報も入力可能となっているので、図 10 では、制御情報のやりとりを示す矢印は双方向となっている。

#### <出力部>

本発明では、任意の生物種の遺伝マーカーを固定化した核酸アレイに対して、集団系統ごとに得られる雑種個体から得られるゲノム試料をハイブリダイズさせる。これにより、雑種個体の網羅的な遺伝子の存在情報を取得し、これを用いて集団系統別に遺伝マーカーを特定し、QTL 解析を行う。したがって、本発明にかかる量的遺伝子座解析システムは、出力部として、QTL 解析の結果を出力するための手段が備えられていればよい。

上記出力部としては、特に限定されるものではないが、具体的には、QTL 解析の結果を画面上で表示（ソフトコピー）するディスプレイ 26、および、QTL 解析の結果を印刷（ハードコピー）するプリンタ 25 の少なくとも何れか、好ましくは両方を備えていればよい。ディスプレイ 26 の具体的な構成は特に限定されるものではなく、公知の CRT ディスプレイや、液晶ディスプレイ、プラズマディスプレイ等といった各種表示装置を好適に用いることができる。また、プ



リント 25 の具体的な構成も特に限定されるものではなく、公知のインクジェットプリンタやレーザープリンタ等の画像形成装置を好適に用いることができる。

上記出力部としては、上記ディスプレイ 26 およびプリンタ 25 に限定されるものではなく、他の手段を用いることもできる。具体的には、まず、前述した外部通信部 22 も出力部として好適に用いることができる。つまり、上記外部通信部 22 は、外部の装置との間で情報の入出力を可能とするものであり、入力部と出力部とを兼ねた構成となっている。これにより、外部のネットワーク等を介して、他の装置に QTL 解析の結果を送信することが可能となるので、本発明にかかる量的遺伝子座解析システムをより効率的に使用することができる。

具体的には、例えば、LAN を介して量的遺伝子座解析システムが外部の装置とつながっている場合には、例えば研究施設等に一つの量的遺伝子座解析システムを設けるのみで、他の研究者はパーソナルコンピュータ等の情報端末を介して当該量的遺伝子座解析システムを共用することができる。さらに、上記量的遺伝子座解析システムの解析結果を、通信ネットワークを介して外部のサーバに蓄積していくこともできる。その結果、解析結果をより一層有効利用することが可能となる。

上記出力部としては、入力部の一つとして説明した記録媒体読書部 23 も好適に用いることができる。すなわち、本発明にかかる量的遺伝子座解析システムにおいては、記録媒体から情報を読み取るだけでなく、書き込みもできるドライブを備えていれば、これを出力部として利用することができる。記録媒体読書部 23 の具体的な構成は特に限定されるものではなく、前記入力部で説明したように、ハードディスクドライブ、フレキシブルディスクドライブ、CD-ROM ドライブ、DVD-ROM ドライブ等の公知のディスクドライブや、各種メモ리카ード、USB メモリ等のメモ리카ートリッジ等を好適に用いることができる。

なお、図 10 に示す構成では、画像情報処理部 31、遺伝地図作成部 32、遺伝マーカー特定部 33、量的遺伝子座決定部 34、制御部 35、およびメモリ 36 で解析部 30 を構成し、それ以外の入力部・出力部は個別に独立した状態で一つのシステムが構築されている例を挙げているが、もちろん本発明はこれに限定されるものではなく、全ての手段が一つの装置になっている構成であってもよい

し、一部の入力部および／または出力部が解析部30と一体化している構成であってもよいし、図10で挙げている以外の手段を含む構成であってもよい。

上記解析部30の具体的な構成は特に限定されるものではなく、従来公知の演算手段、具体的には、コンピュータの中央処理装置（CPU）等であり、その動作はコンピュータプログラムにしたがって実行される構成であればよい。

### (III) 量的遺伝子座解析システムによる解析方法

本発明にかかる量的遺伝子座解析システムで行われる具体的な解析方法は特に限定されるものではないが、具体的には、例えば、図11に示すような12ステップの構成を挙げることができる。

まず、ステップ201（以下、適宜ステップをSと略す）では、各入力部により遺伝地図作成情報（染色体、重要遺伝子や遺伝マーカーの名称、座乗位置等）を入力する。次に、S202では、上記遺伝地図作成部32で上記遺伝地図作成情報に基づき遺伝地図を作成し、遺伝マーカー特定部33に出力する。次に、S203では、入力部から集団系統数を入力し、S204では、集団系統別に、スキャナ21・画像情報処理部31から解析対象となる雑種個体（図11では対象個体）の遺伝子の存在情報（すなわちDNAアレイ解析結果）を入力する。さらに、S205では、遺伝マーカー情報を入力する。

そして、S206では、入力された各情報に基づいて、遺伝マーカー特定部33により、集団系統ごとに存在する遺伝マーカーを特定する。このとき、遺伝マーカーの特定結果をメモリ36に記憶させてもよいし、必要に応じてディスプレイ26に中間表示させてもよい。その後、S207で入力ミスがあるか否か、すなわち補正すべきか否かを確認する。ミスがあれば（図中YES）S208で手動入力部24等により各種情報を入力し直し、S201に戻る。補正する必要がなければ（図中NO）S209に進む。

S209では、入力部から表現型値を入力し、S210では、遺伝マーカーの特定結果および表現型値からインターバルマッピング（QTL解析）を行い、当該表現型の量的遺伝子座を決定する。その後、S211で、QTL解析の結果に基づき、量的形質に関与する遺伝子の位置とその遺伝子の作用を推定する。そして、S212において、解析結果を出力部から出力する。これにより一連の解析

過程が終了する。

#### (IV) 本発明の利用

本発明にかかる量的遺伝子座解析システムの利用方法は特に限定されるものではなく、任意の生物種においてQTL解析を行う用途であれば特に限定されるものではない。具体的な利用の一例としては、任意の生物において有用遺伝子を探索し、それを品種改良に利用する用途を挙げることができる。すなわち、本発明では、上記量的遺伝子座解析システムを、生物の量的形質を解析する量的形質解析方法に好適に用いることができるとともに、任意の形質の発現に関与する遺伝子を探索する遺伝子探索方法に好適に用いることができる。

QTL解析は、2つの遺伝子座間の遺伝地図距離を、組換え価に基づいて推定する解析方法である。遺伝地図距離は、2つの遺伝子座の間で起こる、減数分裂1回あたりの交叉回数の期待値を指し、QTL解析では、集団系統のデータから組み換え価を推定するとともに、組換え価から遺伝地図距離を推定する。

染色体上のどの場所においても交叉が起こる確率は一定であると仮定すると、遺伝地図距離は物理距離に比例する。この比例関係から遺伝地図距離に基づいて物理距離を推定することができる。そこで、物理位置のわかっている遺伝マーカーと、所望の形質の発現に関与する遺伝子との間の遺伝地図距離を求めることで、当該遺伝子の染色体上の位置をほぼ特定することができる。

ただし、2つの遺伝子座の間における染色体上の物理的距離が近ければ組換え価と遺伝地図距離は等しいが、遠くなると組換え価は遺伝地図距離を表さなくなる。2つの遺伝子座の間で交叉が何回起こったのかについては直接観測できず、観測できるのは組換え価である。そこで、遺伝地図関数を用いて組換え価から遺伝地図距離を推定する。

QTL解析を行うためには、通常、遺伝的に異なった2つの集団系統の間で交配を実施し、F<sub>1</sub>およびF<sub>2</sub>などその後の雑種世代を生産し、それらの個体について多数の遺伝マーカーのタイピングを行い、得られるデータを統計処理する。

このようにQTL解析では、遺伝地図距離の推定や、遺伝マーカーのタイピングデータ等を処理する必要があるため、バイオインフォマティクス技術を好適に用いることができる技術分野である。しかしながら、これまではそのような技術

はほとんど提案されていなかった。本発明では、上述したように、量的遺伝子座解析システムを用いて、任意の生物種の遺伝マーカーを固定化した核酸アレイに対して、集団系統ごとに得られる雑種個体から得られるゲノム試料をハイブリダイズさせる。これにより、雑種個体の網羅的な遺伝子の存在情報を取得し、これを用いて集団系統別に遺伝マーカーを特定し、QTL解析を行う。そのため、QTL解析に伴う情報解析を網羅的に進めることができるため、QTL解析を効率的に進めることができる。

したがって、本発明のより具体的な用途としては、遺伝マーカーを利用した品種改良方法において上記量的遺伝子座解析システムを用いる用途を挙げることができる。

本発明にかかる量的形質解析方法、遺伝子探索方法、または品種改良方法を利用できる生物としては、特に限定されるものではなく、植物、動物または微生物の何れであってもよい。特に、染色体を有しメンデル遺伝する生物であれば、本発明の利用対象とすることができる。メンデル遺伝する生物としては、特に限定されるものではないが、商業的に利用され品種改良の要求の高い生物を挙げることができる。

このような生物としては、植物として、各種作物（農林水産業で生産される植物、農作物）を挙げることができる。具体的には、例えば、イネ、コムギ、オオムギ、ライムギ、ライコムギ、トウモロコシ等のイネ科植物；ノリ等の海藻類；各種野菜・花卉類；スギ、ヒノキ等の材木類；等を挙げることができる。また動物としては、各種家畜動物を挙げることができる。具体的には、ウシ、ヒツジ、ブタ等の家畜哺乳類；ニワトリ、ウズラ等の家畜鳥類；ハマチ、タイ、コイ、アユ等の魚類；ミツバチ、カイコなどの家畜昆虫類；カキ、アワビ、ホタテガイ等の貝類；等を挙げることができる。さらに微生物としては、大腸菌等の細菌類、酵母、糸状菌、放線菌、担子菌等を挙げることができる。

上記の中でも、イネ科植物には、イネ、コムギ、トウモロコシまたはオオムギ等、国際的に広く栽培されている穀物が含まれており、重要な戦略作物であるものが多い。それゆえ、これらイネ科植物の品種改良に本発明を適用すれば、優れた形質を有する品種を効率的に得ることができる。

また、本発明を利用できる生物には、実験用に用いられる動植物（実験動物・実験植物）等も含まれる。実験動物としては、具体的には、例えば、マウス、ラット、ショウジョウバエ、線虫等を挙げることができる。また、実験植物としては、具体的には、例えば、シロイヌナズナ等を挙げることができる。なお、本発明においては、本発明を利用して遺伝子を探索する場合等には、上記生物がヒトであってよい。

なお、本発明は、上述した実施の形態の記載に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、当業者は本発明の範囲を逸脱することなく、種々の変更、修正、および改変を行うことができることはいうまでもない。

以上のように、本発明にかかる量的遺伝子座解析システムでは、集団系統ごとに存在する遺伝マーカーを特定するために核酸アレイによるハイブリダイゼーション分析を利用するとともに、これにより特定した遺伝マーカーを用いてQTL解析を行う。その結果、QTL解析に伴う情報解析を網羅的に進めることができるため、QTL解析を効率的に進めることができるという効果を奏する。

#### 〔実施の形態6〕

本発明の一実施形態について図12および図13に基づいて説明すると以下の通りである。なお、本発明はこれに限定されるものではない。

本発明にかかる遺伝子相互作用解析システムは、指定された遺伝子や表現型について、核酸アレイに固定化された遺伝マーカーのハイブリダイゼーション結果に基づいて個別にインターバルマッピング（QTL解析）を行い、関連のある遺伝子の位置と当該遺伝子の作用とを推定する。これにより、指定された遺伝子や表現型の遺伝要因を規定することができ、遺伝子相互作用を効率的に解析することができる。

本発明にかかる遺伝子相互作用解析システムの具体的な構成は特に限定されるものではないが、具体的には、例えば、図12に示すように、画像情報処理部（画像情報処理手段）41、遺伝地図作成部（遺伝地図作成手段）42、遺伝マーカー特定部（遺伝マーカー特定手段）43、スポットマーカー情報生成部（スポットマーカー情報生成手段）44、発現プロファイル情報生成部（発現プロファ

イル情報生成手段) 45、遺伝要因規定部(遺伝要因規定手段) 46、制御部(制御手段) 47、メモリ(記憶手段) 48、スキャナ(画像読取手段、入力手段) 21、外部通信部(外部情報入出力手段) 22、記録媒体読書部(記憶手段、入力手段、出力手段) 23、手動入力部(手動入力手段) 24、プリンタ(画像形成手段、印刷手段、出力手段) 25、ディスプレイ(画像表示手段、出力手段) 26等を備えている構成を挙げることができる。上記構成の遺伝子相互作用解析システムは、入力部、出力部、解析部(解析手段) 40に大別することができる。

### (I) 核酸アレイ

本発明では、所望の生物種において、メンデル分離集団ごとに得られる雑種個体からゲノム試料を調製し、これを核酸アレイにハイブリダイズさせることで当該雑種個体について網羅的な遺伝子の存在情報を取得し、これを遺伝子相互作用の解析に利用する。ここで、上記遺伝子の存在情報を取得するために用いられる核酸アレイとしては、特に限定されるものではなく、公知の核酸アレイを好適に用いることができる。具体的には、例えば、マイクロアレイ、マクロアレイ、ビーズアレイ等を挙げることができる。本実施の形態では、上記核酸としてDNAを用いているので、より具体的な例としては、DNAマイクロアレイやDNAマクロアレイ等のDNAアレイを挙げることができる。

上記DNAアレイについては、前記実施の形態4・5にて詳細に説明しているので、本実施の形態では、その説明を省略する。ここで、本実施の形態でも、前述した染色体座位確認可能アレイを用いることが好ましい。

上記DNAアレイの使用方法について、DNAマイクロアレイを例に挙げて説明すると、まず、DNAマイクロアレイに、蛍光色素で標的したターゲットDNA(以下、ターゲットと略す)をハイブリダイズさせる。このとき、DNAマイクロアレイ上で、プローブと相補的な配列を含むターゲットの分子は、上記プローブの分子と相補的に結合(ハイブリダイズ)するが、それ以外のターゲットの分子は結合しない。そこで、結合していないターゲットの分子を洗浄して除去することで、結合したターゲットの分子のみをマイクロアレイ上に残存させる。このターゲットの分子は蛍光色素で標識されているため、ターゲットの蛍光を、信

号強度として測定し、ハイブリダイズしているプローブを同定する。

本発明では、雑種個体の網羅的な遺伝子の存在情報を取得するため、ハイブリダイゼーションの有無の確認により、個々の対立遺伝子（アレル）の存在を確認することができる。すなわち、個体から取得したゲノムDNAを制限酵素処理する等して断片化し、これをターゲットとしてDNAアレイにハイブリダイズさせることで、DNAアレイ上に存在するプローブと相補的な塩基配列が存在するかどうかを確認することができる。これにより得られる情報を網羅的な遺伝子の存在情報とする。

## （II）遺伝子相互作用解析システムの構成

### ＜入力部＞

本発明では、雑種個体の網羅的な遺伝子の存在情報を、当該雑種個体の属する生物種の遺伝地図、および、当該生物種で明らかとなっている遺伝マーカー情報と照合し、集団系統ごとに存在する遺伝マーカーを特定し、これからスポットマーカー情報（後述）を生成するとともに、解析対象となる任意の表現型および遺伝子を指定した上で、当該表現型を数値化した表現型値と、同一の雑種個体から得られる発現プロファイル情報に含まれる発現遺伝子とが、上記スポットマーカー情報と連鎖しているかどうかを確認する。したがって、本発明にかかる遺伝子相互作用解析システムは、入力部として、上記雑種個体の網羅的な遺伝子の存在情報、上記遺伝マーカー情報、上記表現型値、および上記発現プロファイル情報の少なくとも何れかを入力可能とする手段を備えていればよい。

上記各情報のうち、網羅的な遺伝子の存在情報を入力可能とする手段としては、特に限定されるものではないが、例えば、図12に示す構成では、スキャナ21から核酸アレイの分析結果を画像情報として入力し、画像情報処理部41で当該画像情報を解析して分析結果から遺伝子の存在情報を生成する。したがって、スキャナ21が網羅的な遺伝子の存在情報を入力する手段の一例として挙げることができる。

上記スキャナ21としては特に限定されるものではなく、核酸アレイを用いたハイブリダイゼーションの結果を画像情報として読み取ることが可能な画像読取手段であればよい。より具体的には、核酸アレイから、プローブにハイブリ

ダイズしたターゲットの蛍光を、信号強度という画像データとして読み取ること  
で、遺伝子の発現量を検出する。したがって、上記スキャナ21としては、公知  
の蛍光スキャナ21等を好適に用いることができる。

ここで、スキャナ21から得られる画像情報は、必要な情報処理を行うことに  
より、遺伝子の存在情報として生成される。したがって、本発明では、図12に  
示すように、得られた画像情報を解析し、網羅的な遺伝子の存在情報を生成する  
画像情報処理部41を備えていることが好ましい。画像情報処理部41の具体的  
な構成は、特に限定されるものではなく、公知の解析システムを用いることがで  
きる。

次に、遺伝マーカー情報および表現型値を入力する手段としては、特に限定さ  
れるものではないが、図12に示す構成では、外部通信部22、記録媒体読書部  
23、手動入力部24等がこれに相当する。また、発現プロファイル情報は、後  
述するように、核酸アレイの分析結果を読み取って生成することができるが、予  
め発現プロファイル解析を行っておくことにより取得された発現プロファイル情  
報を適宜入力してもよい。それゆえ、発現プロファイル情報を入力可能とする手  
段としては、外部通信部22、記録媒体読書部23等も用いることができる。

さらに、本発明では、集団系統ごとに存在する遺伝マーカーを特定するために  
遺伝地図を用いる。そこで、上記各情報に加えて、遺伝地図または遺伝地図を作  
成するための遺伝地図情報を入力する手段を備えていることが好ましい。上記遺  
伝地図または遺伝地図作成情報を入力する手段としても、上記外部通信部22、  
記録媒体読書部23、手動入力部24等が好適に用いられる。

外部通信部22は、外部の装置との間で情報の入出力を可能とする構成であれ  
ば特に限定されるものではなく、公知のLANカード、LANボード、LANア  
ダプタや、モデム等の公知の通信用インターフェースを用いればよい。また、記  
録媒体読書部23の具体的な構成も特に限定されるものではなく、例えば、ハー  
ドディスクドライブ、フレキシブルディスクドライブ、CD-ROMドライブ、  
DVD-ROMドライブ等の公知のディスクドライブや、各種メモ리카ード、U  
SBメモリ等のメモ리카ートリッジ等を好適に用いることができる。手動入力部  
24の具体的な構成も特に限定されるものではなく、キーボードやタブレット等



、従来公知の入力手段を好適に用いることができる。

上記遺伝マーカー情報としては、核酸アレイに固定化されている位置情報を挙  
げることができる。すなわち、相補的な塩基配列を有する核酸分子が存在すれば  
、ハイブリダイゼーションによりスポットが検出されるので、核酸アレイのどの  
5 位置に固定化されているスポットがどの遺伝マーカーに相当するかが明らかとな  
れば、遺伝マーカー情報として利用することができる。

上記表現型値は、任意の表現型を数値化したものであれば特に限定されるもの  
ではない。例えば、本発明者らは、オオムギの赤カビ病抵抗性について、「切り  
穂検定法」を改変した0（抵抗性）～10（罹病性）のスコアで評価している（  
10 武田和義、部田英雄、1989、「オオムギにおける赤かび病検定法の開発と耐  
病性品種の検索」育種学雑誌39参照）。したがって、解析対象となる生物種お  
よび注目する形質によってこのような表現型値を利用すればよい。

上記遺伝地図は、実験動物や一部の農作物・家畜動物等では染色体地図として  
すでに完成されているものが比較的多いが、大部分の農作物や家畜動物等につい  
15 ては、十分な遺伝地図が作成されていないことも多い。したがって、遺伝地図が  
すでに作成されている場合には、それを入力すればよいし、遺伝地図が作成され  
ていない場合には、遺伝地図作成情報を入力し、図12に示す遺伝地図作成部4  
2により新たに遺伝地図を作成すればよい。なお、遺伝地図作成部42について  
は、後に詳述する。

上記発現プロファイル情報は、細胞内での遺伝子発現を網羅的に解析して得ら  
れる情報であれば特に限定されるものではなく、上述したように、すでに解析済  
みの情報を入力してもよいが、解析対象となる雑種個体について、適宜発現プロ  
ファイル解析を行うことがより好ましい。したがって、発現プロファイル情報を  
20 入力する手段としては、すでに解析済の情報だけでなく、適宜、発現プロファイ  
ルを読み取ってから解析することにより発現プロファイル情報を生成してもよい  
。

このとき発現プロファイルを読み取る手段としては、上記スキャナ21等の画  
像読取手段を挙げることができる。また、このとき読み取りの対象となる実験系  
（発現プロファイル実験を行うための実験系）は特に限定されるものではなく、

網羅的な遺伝子の存在情報を得るために用いられた核酸アレイを用いてもよいが、それ以外の実験系を用いることもできる。上記核酸アレイとしては、上述したように、マイクロアレイ、マクロアレイ、またはビーズアレイを挙げることができるが、発現プロファイル実験を行うための実験系としては、さらにディファレンシャルディスプレイを利用することができる。

ディファレンシャルディスプレイは、異なる条件下にある細胞における遺伝子の発現量の差をゲル上のバンドプロファイルの差として検出し、その遺伝子を回収、同定する技術である。より具体的には、例えば蛍光ディファレンシャルディスプレイを例に挙げて説明すると、全RNAから蛍光標識したcDNAのPCR産物を得た上で、当該PCR産物を変性ポリアクリルアミドゲルで分離した後に、蛍光イメージを信号強度として測定する。

上記ディファレンシャルディスプレイでは、全mRNAを網羅的に解析する方法ではないが、少量のmRNAで多数の試料を同時に比較できるため、核酸アレイと同様に発現プロファイル実験が実施可能である。そのため、上記入力部としては、電気泳動後のポリアクリルアミドゲルのゲル板から信号強度を検出できる画像読取手段が設けられていればよい。

さらに、本発明にかかる遺伝子相互作用解析システムでは、上記雑種個体の網羅的な遺伝子の存在情報、遺伝マーカー情報、および遺伝地図作成情報の少なくとも何れかを修正可能とする手段も設けられていることが好ましい。具体的には、図12に示す構成では、上記手動入力部24がこれに相当する。

後述するように、本発明にかかる遺伝子相互作用解析システムでは、その解析過程において、特に、遺伝マーカー特定時には、一度入力ミスがあるか否かを確認するステップを行う。これにより最終的に得られる後段のインターバルマッピングの信頼性を高めることができる。それゆえ、この入力ミスを補正するための手段が備えられていることが好ましく、具体的には、手動入力部24を挙げることができる。もちろん、補正するための手段は手動入力部24に限定されるものではなく、他の手段であってもよい。

#### <解析部>

本発明では、遺伝マーカーを特定し、これからスポットマーカー情報（後述）

を生成した後に、発現プロファイル情報に含まれる発現遺伝子が、上記スポット  
マーカー情報と連鎖しているか否かを確認することにより、任意の表現型の遺伝  
要因を規定する。したがって、本発明にかかる遺伝子相互作用解析システムは、  
上記入力部から入力された情報を解析する解析部40が必須構成として含まれる  
5 。解析部40としては、図12に示すように、少なくとも、遺伝マーカー特定部  
43、スポットマーカー情報生成部44、遺伝要因規定部46が設けられていれ  
ばよい。

上記遺伝マーカー特定部43は、上記スキャナ21から読み込まれ、画像情報  
処理部41で生成された遺伝子の存在情報を、上記遺伝地図および遺伝マーカー  
10 情報と照合し、集団系統ごとに存在する遺伝マーカーを特定する。具体的には、  
前述したように、核酸アレイに固定化されている遺伝マーカーの位置情報と、遺  
伝地図との照合から、任意の雑種個体に当該遺伝マーカーが含まれているか否か  
を判定し、含まれていることが分かれば、その遺伝マーカーを、当該雑種個体の  
属する集団系統の遺伝マーカーとして特定する。

15 ここで、上記雑種個体の遺伝子の存在情報を取得する場合に、核酸アレイとし  
て、上述した染色体座位確認可能アレイを用いれば、固定化されている位置の順  
序を遺伝マーカー情報として用いることができる。換言すれば、スポットの序数  
を遺伝マーカー情報として利用することも可能である。そのため、遺伝マーカー  
特定部43における照合処理をより容易化することができるため、非常に好まし  
20 い。また、このとき用いられる遺伝マーカー情報は、上述したように、多型を有  
する遺伝マーカー（SNPまたはRFLP）であれば、各集団系統に典型的な遺  
伝マーカーとして容易に識別が可能になるため、好ましい。

上記スポットマーカー情報生成部44は、遺伝マーカー特定部43により特定  
された遺伝マーカーと上記核酸アレイに固定化されている遺伝マーカーとを照合  
25 することにより、核酸アレイにおける個々のスポットのハイブリダイゼーション  
結果を、解析用の遺伝マーカー情報であるスポットマーカー情報として生成する。  
より具体的には、特定された遺伝マーカーと核酸アレイ上の遺伝マーカーとを  
照合し、ハイブリダイゼーションにより存在が明らかとなった遺伝マーカーのス  
ポットのみを、スポットマーカー情報として生成する。これにより、核酸アレイ

上のハイブリダイズしたスポットを、集団系統ごとに存在する遺伝マーカーそのものとして用いることができる。

ここで、上記核酸アレイとしては、上述した染色体座位確認可能アレイを用いれば、固定化されている位置の順序を遺伝マーカー情報として用いることができる。この場合、スポットマーカー情報を生成するときには、スポットとして固定化されている位置の順序から、固定化されている具体的な遺伝マーカーを逆算し、この遺伝マーカーを上記特定された遺伝マーカーと照合することになる。そこで、スポットマーカー情報には、遺伝マーカーが核酸アレイに固定化されている位置情報も含まれていることが好ましい。これにより、染色体座位確認可能アレイを用いて発現プロファイル情報を取得した場合には、実質的に、上記位置情報をスポットマーカー情報として用いることができる上に、当該位置情報から具体的な遺伝マーカーを容易に特定することが可能となる。

上記遺伝要因規定部46は、解析対象となる任意の表現型および遺伝子を指定した上で、当該表現型を数値化した表現型値と、同一の雑種個体から得られる発現プロファイル情報に含まれる発現している任意の遺伝子とが、複数のスポットマーカー情報と連鎖しているか否かを確認することにより、上記任意の表現型の遺伝要因を、発現している遺伝子により規定する。これにより、指定した表現型と当該表現型の発現に関与する遺伝子を基準として、連鎖の有無により、関連性の高い他の遺伝子をスポットマーカー情報から選択することができる。

より具体的には、表現型(形質)Pに関与する遺伝子として遺伝子p1が知られている場合、表現型Pを数値化した表現型値Vpおよび遺伝子p1を指定しておき、上記スポットマーカー情報と表現型値Vpおよび遺伝子p1との連鎖を確認する。これにより、連鎖しているスポットマーカー情報として、例えば、遺伝マーカーmp2およびmp3が確認される。このとき、これら遺伝マーカーが遺伝子p2およびp3のマーカーであるとすれば、表現型Pおよび遺伝子p1と相互作用する遺伝子として、遺伝子p2およびp3が特定されたことになる。もちろん、既知の遺伝子とリンクしていなくても遺伝マーカーそのもので遺伝要因を決定することもできる。したがって、上記遺伝要因規定部46では、表現型の遺伝要因を規定する情報としては、少なくとも遺伝マーカーを用いればよく、好ま

しくは既知の具体的な遺伝子も含んでいればよい。

さらに、連鎖しているスポットマーカ情報が確認されない場合、最も近接する遺伝マーカの間で量的遺伝子座 (QTL) を推定し、このQTLで遺伝要因を規定することもできる。したがって、スポットマーカ情報として用いられる  
5 遺伝マーカが、遺伝地図上で連鎖が検出可能な密度で存在していれば、高い頻度で連鎖する遺伝マーカを特定できなくても、QTLにより遺伝要因を規定することが可能となる。

このように、遺伝要因規定部46では、表現型と連鎖する遺伝マーカ（または遺伝子、QTL）を確認することにより、当該遺伝マーカから、上記表現型の発現に  
10 関与する遺伝子の位置や作用を推定することが可能となる。また、遺伝要因規定部46では、さらに、表現型の遺伝要因を規定する情報として、当該遺伝マーカに関わる遺伝子の発現量を用いることもできる。

上記指定された表現型値および遺伝子と複数のスポットマーカ情報とが連鎖しているか否かについては、インターバルマッピングにより解析すればよい。インターバルマッピングの方法としては、特に限定されるものではないが、具体的  
15 には、例えば、Simple Interval Mapping (SIM)、Composite Interval Mapping (CIM) 等を用いることができる。また、インターバルマッピングの具体的な解析には、公知の解析システムを用いることができる。具体的には、例えば、MAPMAKER/QTLやQTL Cartographer等の解析用ソフトウェアを使用  
20 した解析システムを挙げることができる。

本発明にかかる遺伝子相互作用解析システムにおいては、上記遺伝マーカ特定部43、スポットマーカ情報生成部44、および遺伝要因規定部46に加えて、発現プロファイル情報生成部45が備えられていてもよい。発現プロファイル情報生成部45は、前述したように、同一の雑種個体から得られる網羅的な遺  
25 伝子の発現量について発現プロファイル解析することにより、当該雑種個体の発現プロファイル情報を生成する構成である。このとき、前述したように、マイクロアレイ、マクロアレイ、ビーズアレイおよびディファレンシャルディスプレイの少なくとも何れかの実験系を用いて、遺伝子発現を網羅的に測定し、上記発現プロファイル情報を生成すればよい。

また、上記発現プロファイル情報生成部 4 5 では、雑種個体の網羅的な遺伝子の存在情報を得るために用いられた核酸アレイあるいは同一のサンプルがスポットされた核酸アレイを用いて発現プロファイル情報を生成することもできる。すなわち、図 1 2 に示す構成では、スキャナ 2 1 で発現プロファイル実験の結果を読み込み、画像処理部 1 1 で画像処理してからさらに発現プロファイル情報生成部 4 5 で発現プロファイル情報を生成すればよい。

さらにこのとき、遺伝マーカー特定用（および遺伝地図作成用）の分析データと発現プロファイル用の分析データとを同時に取得できるのであれば、より効率的な解析が可能となる。例えば、核酸アレイのハイブリダイゼーション実験において、4 種類以上の異なる標識が可能となっていれば、1 枚の核酸アレイから、遺伝マーカー特定用の標識 2 種類と遺伝子発現用の標識 2 種類とを設定することで、遺伝マーカー特定用（および遺伝地図作成用）の分析データと発現プロファイル用の分析データとを同時に取得することができる。

なお、図 1 2 に示す構成では、発現プロファイル情報生成部 4 5 と画像情報処理部 4 1 とは一体化されていてもよい。すなわち、画像情報処理部 4 1 により発現プロファイル情報が生成されてもよい。

本発明にかかる遺伝子相互作用解析システムにおいては、上記遺伝マーカー特定部 4 3、スポットマーカー情報生成部 4 4、発現プロファイル情報生成部 4 5、遺伝要因規定部 4 6 に加えて、前記遺伝地図作成部 4 2 が備えられていてもよい。遺伝地図作成部 4 2 は、遺伝地図作成情報に基づき、上記雑種個体の属する生物種の遺伝地図を作成する。前述したように、生物種によっては遺伝地図が作成されているものもあるが、遺伝地図が作成されていない生物種も多いことから、遺伝地図作成部 4 2 を備えることが好ましい。

遺伝地図作成部 4 2 は、種々の遺伝地図作成情報に基づいて、染色体ごとに遺伝地図を作成するようになっていれば特に限定されるものではない。このとき用いられる遺伝地図作成情報としては、具体的には、例えば、解析対象の生物種で知られている遺伝子および／または遺伝マーカーの名称と、当該遺伝子および／またはマーカーの染色体上の座標位置とが少なくとも用いられればよい。

なお、上記遺伝地図作成情報を入力するための手段としては、特に限定される

ものではなく、上述した各入力部、例えば、図12に示す外部通信部22、記録媒体読書部23、手動入力部24等を用いることができる。

さらに、前述した染色体座位確認可能アレイを用いることで、座乗位置未知の遺伝マーカーをマッピングすることにより遺伝地図を作成することができる。具体的には、まず、染色体座位確認可能アレイに対して、解析対象の生物種のメンデル分離集団から得られるターゲットをそれぞれハイブリダイズして、遺伝地図を作成するとともに、座乗位置が未知の遺伝マーカーを同一の染色体座位確認可能アレイにハイブリダイズさせることによって、未知の遺伝マーカーの座乗位置を決定することができる。これにより、密度の高い遺伝地図を作成することも可能となる。

また、上記の例では、染色体座位確認可能アレイとして同一のアレイを用いたが、座乗位置道の遺伝マーカーをマッピングする方法はこれに限定されるものではない。例えば、同じターゲットを異なるアレイ上の遺伝マーカーに処理することでマッピングすることも可能である。このとき、Single Feature Polymorphism (SFP) のように、遺伝子の発現量がメンデル分離すれば、SNPやRFLPによる多型を検出できなくても、当該遺伝子をマッピングすることができる。

したがって、本発明にかかる遺伝子相互作用解析システムにおいては、遺伝マーカーを特定する前段で、遺伝地図作成部42で遺伝地図を作成するために、スキャナ21・画像情報処理部41によりアレイからハイブリダイゼーション結果を読み取って解析処理をしてもよい。それゆえ、図12に示すように、画像情報処理部41からは遺伝地図作成部42に対しても情報を出力（図中の矢印）できるようにになっている。

ここで、上記遺伝地図作成部42により作成した遺伝地図や、遺伝マーカー特定部43で特定された遺伝マーカーに関する情報、スポットマーカー情報生成部44で生成されたスポットマーカー情報、発現プロファイル情報生成部45で生成された発現プロファイル情報、遺伝要因規定部46で生成された遺伝要因に関する情報等は、メモリ48に一旦記憶しておくこともできる。図12に示す解析部40に備えられているメモリ48は、本発明にかかる遺伝子相互作用解析シ

テムで利用されたり生成されたりする各種情報を記憶する記憶部であり、制御部  
47により記憶動作が制御されるようになっている。メモリ48の具体的な構成  
は特に限定されるものではないが、例えば、RAMやROM等の半導体メモリ等  
を挙げることができる。なお、入力部の一つとして説明した記録媒体読書部23  
5 も本発明の記憶部として用いることができる。この点については、次の出力部の  
項で具体的に説明する。

図12に示す構成の解析部40では、解析部40全体の動作、さらには、遺伝  
子相互作用解析システム全体の動作を制御する制御部47が設けられている。図  
12に示す構成では、画像情報処理部41、遺伝地図作成部42、遺伝マーカー  
10 特定部43、スポットマーカー情報生成部44、発現プロファイル情報生成部4  
5、遺伝要因規定部46およびメモリ48の各手段に対して、上記制御部47か  
ら制御情報が出力され、この制御情報に基づいて上記各手段が連携して動作する  
ことで、上記遺伝子相互作用解析システム全体が動作する。また、制御部47に  
対しては、各手段から各種情報も入力可能となっているので、図12では、制御  
15 情報のやりとりを示す矢印は双方向となっている。

#### <出力部>

本発明では、発現プロファイル情報に含まれる発現遺伝子と上記スポットマ  
ーカー情報とが連鎖しているか否かを確認することにより、任意の表現型の遺伝要  
因を規定する。したがって、本発明にかかる遺伝子相互作用解析システムは、出  
20 力部として、遺伝要因を規定した結果を出力するための手段が備えられていれ  
ばよい。

上記出力部としては、特に限定されるものではないが、具体的には、遺伝要因  
の規定結果を画面上で表示（ソフトコピー）するディスプレイ26、および、遺  
伝要因の規定結果を印刷（ハードコピー）するプリンタ25の少なくとも何れか  
25 、好ましくは両方を備えていればよい。ディスプレイ26の具体的な構成は特に  
限定されるものではなく、公知のCRTディスプレイや、液晶ディスプレイ、プ  
ラズマディスプレイ等といった各種表示装置を好適に用いることができる。また  
、プリンタ25の具体的な構成も特に限定されるものではなく、公知のインクジ  
ェットプリンタやレーザープリンタ等の画像形成装置を好適に用いることができ



る。

上記出力部としては、上記ディスプレイ 26 およびプリンタ 25 に限定されるものではなく、他の手段を用いることもできる。具体的には、まず、前述した外部通信部 22 も出力部として好適に用いることができる。つまり、上記外部通信部 22 は、外部の装置との間で情報の入出力を可能とするものであり、入力部と出力部とを兼ねた構成となっている。これにより、外部のネットワーク等を介して、他の装置に QTL 解析の結果を送信することが可能となるので、本発明にかかる遺伝子相互作用解析システムをより効率的に使用することができる。

具体的には、例えば、LAN を介して遺伝子相互作用解析システムが外部の装置とつながっている場合には、例えば研究施設等に一つの遺伝子相互作用解析システムを設けるのみで、他の研究者はパーソナルコンピュータ等の情報端末を介して当該遺伝子相互作用解析システムを共用することができる。さらに、上記遺伝子相互作用解析システムの解析結果を、通信ネットワークを介して外部のサーバに蓄積していくこともできる。その結果、解析結果をより一層有効利用することが可能となる。

上記出力部としては、入力部の一つとして説明した記録媒体読書部 23 も好適に用いることができる。すなわち、本発明にかかる遺伝子相互作用解析システムにおいては、記録媒体から情報を読み取るだけでなく、書き込みもできるドライブを備えていれば、これを出力部として利用することができる。記録媒体読書部 23 の具体的な構成は特に限定されるものではなく、前記入力部で説明したように、ハードディスクドライブ、フレキシブルディスクドライブ、CD-ROM ドライブ、DVD-ROM ドライブ等の公知のディスクドライブや、各種メモ리카ード、USB メモリ等のメモ리카ートリッジ等を好適に用いることができる。

なお、図 12 に示す構成では、画像情報処理部 41、遺伝地図作成部 42、遺伝マーカー特定部 43、スポットマーカー情報生成部 44、発現プロファイル情報生成部 45、遺伝要因規定部 46、制御部 47、およびメモリ 48 で解析部 40 を構成し、それ以外の入力部・出力部は個別に独立した状態で一つのシステムが構築されている例を挙げているが、もちろん本発明はこれに限定されるものではなく、全ての手段が一つの装置になっている構成であってもよいし、一部の入

力部および／または出力部が解析部40と一体化している構成であってもよいし、図12で挙げている以外の手段を含む構成であってもよい。

上記解析部40の具体的な構成は特に限定されるものではなく、従来公知の演算手段、具体的には、コンピュータの中央処理装置（CPU）等であり、その動作はコンピュータプログラムにしたがって実行される構成であればよい。

### (III) 遺伝子相互作用解析システムによる解析方法

本発明にかかる遺伝子相互作用解析システムで行われる具体的な解析方法は特に限定されるものではないが、具体的には、例えば、図13に示すような16ステップの構成を挙げることができる。

まず、ステップ301（以下、適宜ステップをSと略す）では、各入力部により遺伝地図作成情報（染色体、重要遺伝子や遺伝マーカーの名称、座乗位置等）を入力する。次に、S302では、上記遺伝地図作成部42で上記遺伝地図作成情報に基づき遺伝地図を作成し、遺伝マーカー特定部43に出力する。次に、S303では、入力部から集団系統数を入力し、S304では、集団系統別に、スキャナ21・画像情報処理部41から解析対象となる雑種個体（図13では対象個体）の遺伝子の存在情報（すなわちDNAアレイ解析結果）を入力する。さらに、S305では、遺伝マーカー情報を入力する。

次に、S306では、入力された遺伝子の存在情報、遺伝地図、および、遺伝マーカー情報から遺伝マーカー特定部43により、集団系統ごとに存在する遺伝マーカーを特定する。このとき、遺伝マーカーの特定結果をメモリ48に記憶させてもよいし、必要に応じてディスプレイ26に中間表示させてもよい。さらに、S307では、S306で特定された遺伝マーカーと、上記DNAアレイに固定化されている遺伝マーカーとを照合し、DNAアレイの個々のスポットをスポットマーカー情報として生成する。このスポットマーカー情報もメモリ48に記憶させてもよいし、必要に応じてディスプレイ26に中間表示させてもよい。その後、S308で入力ミスがあるか否か、すなわち補正すべきか否かを確認する。ミスがあれば（図中YES）S309で手動入力部24等により各種情報を入力し直し、S301に戻る。補正する必要がなければ（図中NO）S310に進む。

S 3 1 0では、入力部から表現型値を入力し、さらに、S 3 1 1では、入力部から解析対象となる雑種個体の発現プロファイル情報を入力する。次に、S 3 1 2では、発現プロファイル情報生成部45により、S 3 1 1で入力した発現プロファイル情報から発現量に差のある遺伝子を同定する。このとき、同定された遺  
5 伝子については、メモリ48に記憶させてもよいし、必要に応じてディスプレイ26に中間表示させてもよい。そして、S 3 1 3では、入力部により解析対象となる任意の表現型および遺伝子を指定する。

その後、S 3 1 4では、S 3 1 0で入力した上記表現型値と、S 3 1 2で同定した発現遺伝子とから、インターバルマッピング（QTL解析）を行い、複数の  
10 スポットマーカー情報と上記表現型値および発現遺伝子が連鎖しているか否かを確認する。その後、S 3 1 5で、QTL解析の結果に基づき、関連する遺伝子および／または遺伝マーカーを推定し、これにより指定した表現型・遺伝子の遺伝要因を規定する。このとき、遺伝要因の規定結果をメモリ48に記憶させてもよいし、必要に応じてディスプレイ26に中間表示させてもよい。その後、S 3 1  
15 6で、解析結果から解析対象の遺伝子等を補正すべきか否かを確認する。補正すべきであれば（図中YES）S 3 1 3に戻る。補正する必要がなければ（図中NO）S 3 1 7に進む。そして、S 3 1 7において、解析結果を出力部から出力する。これにより一連の解析過程が終了する。

#### （IV）本発明の利用

20 本発明にかかる遺伝子相互作用解析システムの利用方法は特に限定されるものではなく、任意の生物種において、所望の表現型（形質）に関与する複数の遺伝子間の相互作用を解析する用途であれば特に限定されるものではない。

前述したように、発現プロファイル解析の技術では、遺伝子群のクラスター化や遺伝子間の発現のネットワークを解析する技術が知られている。このような解  
25 析手法は、包括的かつ網羅的な遺伝子発現状況を解析するためには有用である。しかしながら、上記解析手法は、未知の状況から関連性の深い遺伝子を抽出するという解析手法であって、先に解析対象となる形質や遺伝子を先に指定した上で、これらに関連性の高い遺伝要因を抽出するという用途には利用できない。したがって、本発明にかかる遺伝子相互作用解析システムを用いれば、複数の遺伝子

間の相互作用を解析する場合に、注目すべき形質や遺伝子を先に指定することができるので、発現プロファイル解析とは異なる遺伝子の相互作用の解析を行うことが可能である。

5 それゆえ、本発明にかかる遺伝子相互作用解析システムは、遺伝子相互作用解析方法に利用できるだけでなく、先に解析対象となる形質や遺伝子を指定した上で、それに関与する遺伝子を探索する遺伝子探索方法にも好適に利用することができる。

10 一方、背景技術で例示した特許文献6に開示されている技術では、発現プロファイル解析のために、注目する評価指標と関係の深い遺伝子を抽出し、評価指標データを推定している。この技術では、先に注目する評価指標データを入力してから解析を行うため、一見すると本発明と類似した構成を有している。しかしながら、この技術は、DNAアレイを用いて得られる結果から発現プロファイルを解析するための技術であり、本発明のように、DNAアレイのスポットを遺伝マーカー（スポットマーカー情報）として用いるとともに、当該遺伝マーカーを利用してQTL解析を行う解析処理はなされていない。

15 本発明では、発現プロファイル、すなわち網羅的に遺伝子の発現状態を解析するのではなく、解析対象を遺伝子相互の作用関係に注目した解析を行うことにより、網羅的な解析では明らかとなりにくかった所望の遺伝子間の関係をより明確にすることができる。それゆえ、網羅的な解析で明らかになった遺伝子について、さらに詳細な解析を行いたいような用途に、本発明を良好に利用することができる。

20 また、通常、クラスター化の技術を用いた場合、クラスタリングによって特定の形質について発現量の異なる遺伝子群が検出されると、これらの遺伝子の関係を特定するために、各遺伝子のアノテーションや既知のパスウェイ解析を行ったり、さらには実験生物学的に生物内に直接標識遺伝子を導入して確認したりすることになる。これに対して、本発明では、メンデル分離集団に対して核酸アレイによる分析を適用することで、遺伝学的に当該発現クラスターに含まれる個々の遺伝子の相互作用を探索的に同定することができる。すなわち、未知の発現遺伝子に関しても相互作用を同定することができるため、その機能が明らかにならな

くても、形質に関連する遺伝子群として遺伝学的な関連を推定することができる。また、それらの遺伝子はマップされているので、品種改良によって全ての遺伝子を導入可能であり、さらにQTL解析によってそれらの遺伝子群が導入された場合にどの程度形質が変化するかを統計的に解析することが可能となる。

5       本発明のより具体的な用途としては特に限定されるものではないが、例えば、遺伝マーカーを利用した品種改良方法において上記遺伝子相互作用解析システムを用いる用途を挙げることができる。例えば、品種改良（育種）上で注目される形質や遺伝子を指定し、これらと関連性の高い遺伝子や遺伝マーカーを遺伝要因として規定することで、品種改良をより効率的に進めることが可能となる。

10       本発明における品種改良方法を利用できる生物としては、特に限定されるものではなく、植物、動物または微生物の何れであってもよい。特に、染色体を有しメンデル遺伝する生物であれば、本発明の利用対象とすることができる。メンデル遺伝する生物としては、特に限定されるものではないが、商業的に利用され品種改良の要求の高い生物を挙げることができる。

15       このような生物としては、植物として、各種作物（農林水産業で生産される植物、農作物）を挙げることができる。具体的には、例えば、イネ、コムギ、オオムギ、ライムギ、ライコムギ、トウモロコシ等のイネ科植物；ノリ等の海藻類；各種野菜・花卉類；スギ、ヒノキ等の材木類；等を挙げることができる。また動物としては、各種家畜動物を挙げることができる。具体的には、ウシ、ヒツジ、  
20       ブタ等の家畜哺乳類；ニワトリ、ウズラ等の家畜鳥類；ハマチ、タイ、コイ、アユ等の魚類；ミツバチ、カイコなどの家畜昆虫類；カキ、アワビ、ホタテガイ等の貝類；等を挙げることができる。さらに微生物としては、大腸菌等の細菌類、酵母、糸状菌、放線菌、担子菌等を挙げることができる。

25       上記の中でも、イネ科植物には、イネ、コムギ、トウモロコシまたはオオムギ等、国際的に広く栽培されている穀物が含まれており、重要な戦略作物であるものが多い。それゆえ、これらイネ科植物の品種改良に本発明を適用すれば、優れた形質を有する品種を効率的に得ることができる。

      また、本発明を利用できる生物には、実験用に用いられる動植物（実験動物・実験植物）等も含まれる。実験動物としては、具体的には、例えば、マウス、ラ

ット、ショウジョウバエ、線虫等を挙げるができる。また、実験植物としては、具体的には、例えば、シロイヌナズナ等を挙げるができる。なお、本発明においては、本発明を利用して遺伝子を探索する場合等には、上記生物がヒトであってもよい。

5        以上のように、本発明にかかる遺伝子相互作用解析システムでは、マッピング用の遺伝マーカーのデータと遺伝子発現データとを取得し、表現型のデータと合わせて、それぞれの遺伝子の発現量を目的変量として個々にQTL解析する。そのため、解析対象となる形質や遺伝子を先に指定してから、関連のある遺伝子を推定することになる。それゆえ、解析したい形質や遺伝子について関連性の高い  
10        遺伝子を効率的に推定することができるとともに、例えば、遺伝要因を遺伝マーカーそのもので規定できない場合であっても、インターバルマッピングにより遺伝マーカー間に存在する量的遺伝子座（QTL）として推定することができる。

      その結果、遺伝子の相互作用をより絞り込んだ条件で効率的に解析することが可能となるので、遺伝子の相互作用を、連鎖情報やQTL情報等も含めてより詳細に解析することができるという効果を奏する。  
15

      尚、発明を実施するための最良の形態の項においてなした具体的な実施態様または実施例は、あくまでも、本発明の技術内容を明らかにするものであって、そのような具体例にのみ限定して狭義に解釈されるべきものではなく、本発明の精神と次に記載する特許請求の範囲内で、いろいろと変更して実施することができるものである。  
20

#### 産業上の利用の可能性

      以上のように、本発明では、アレイにおいて固定化される生体物質や合成物質を、生体物質に対応する遺伝子を基準として染色体上にコードされている順序で  
25        配列させて解析している。それゆえ、遺伝子型の同定や遺伝子診断、あるいは品種改良の選抜等より実用的な用途に用いることが可能であるとともに、アレイの解析の信頼性を向上させること等も可能となる。その結果、本発明では、各種アレイを用いた研究用の試薬や試料等の生産や、分析技術に関わる産業分野に好適に用いることができるだけでなく、例えば、メンデル遺伝する生物の遺伝子型の

同定や品種改良等、各種種苗産業や畜産・水産業等にも応用の可能性が見出され、さらには、遺伝子診断等、医学的・薬学的な分野への応用の可能性も見出される。

また、本発明では、雑種世代の各個体からゲノムを取得し、核酸アレイによるハイブリダイゼーション結果を得るのみで、当該個体の遺伝子型を明確に判定または確認することができる。その結果、本発明では、各種アレイを用いた分析技術に関わる産業分野に好適に用いることができるだけでなく、例えば、メンデル遺伝する生物の遺伝子型の同定や品種改良等、各種種苗産業や畜産・水産業等にも応用の可能性が見出され、さらには、遺伝子診断等、医学的・薬学的な分野への応用の可能性も見出される。

さらに、本発明では、アレイ技術を利用してQTL解析を効率的に進めることができる。その結果、本発明では、各種アレイを用いた分析技術に関わる産業分野に好適に用いることができるだけでなく、例えば、メンデル遺伝する生物の遺伝子型の同定や品種改良等、各種種苗産業や畜産・水産業等にも応用の可能性が見出され、さらには、遺伝子診断等、医学的・薬学的な分野への応用の可能性も見出される。

また、本発明では、遺伝子の相互作用をより絞り込んだ条件で効率的かつ詳細に解析することができる。その結果、本発明では、各種アレイを用いた分析技術に関わる産業分野に好適に用いることができるだけでなく、例えば、メンデル遺伝する生物の遺伝子型の同定や品種改良等、各種種苗産業や畜産・水産業等にも応用の可能性が見出され、さらには、遺伝子診断等、医学的・薬学的な分野への応用の可能性も見出される。

## 請 求 の 範 囲

1. 任意の生物から得られた複数種類の生体物質、または、生体物質と相互作用する合成物質を、支持体上に規則的に配列させて固定化してなっており、

5 さらに、上記複数種類の生体物質または合成物質は、各生体物質に対応するそれぞれの塩基配列のブロックが染色体上に並んでいる順序が確認可能に配列されていることアレイ。

2. 上記複数種類の生体物質または合成物質の配列の少なくとも一部には、各生体物質に対応するそれぞれの塩基配列のブロックが染色体上に並んでいる順序  
10 で配列されている個所が含まれている請求の範囲1に記載のアレイ。

3. さらに、支持体上には、各生体物質に対応するそれぞれの塩基配列のブロックが染色体上に並んでいる順序を指示する標識が設けられている請求の範囲1または2に記載のアレイ。

4. さらに、固定化されている生体物質または合成物質それぞれについて、各  
15 生体物質に対応するそれぞれの塩基配列のブロックが染色体上に並んでいる順序に対応する配列位置情報が付与されており、

使用時には、データの取得とともに、これら配列位置情報を読み取って、上記データの配列の順序を染色体上に並んでいる順序に並べ変え可能となっている請求の範囲1に記載のアレイ。

20 5. 上記支持体が、個々の生体物質または合成物質を固定化する小支持体の集団からなっていると同時に、

各小支持体には、各生体物質に対応するそれぞれの塩基配列のブロックが染色体上に並んでいる順序に対応する配列位置情報が付与されており、

この配列位置情報に基づいて、取得したデータの配列の順序を、染色体上に並  
25 んでいる順序に並べ変える請求の範囲1に記載のアレイ。

6. 生体物質として、核酸またはポリペプチドが用いられる請求の範囲1ないし5の何れか1項に記載のアレイ。

7. 上記核酸として、DNAが用いられる請求の範囲6に記載のアレイ。

8. 上記DNAとして、遺伝マーカー、ゲノムDNA、制限酵素処理したゲノ



ΔDNA、cDNA、EST、または合成オリゴDNAが用いられる請求の範囲7に記載のアレイ。

9. 上記支持体上に固定化される複数のDNAは遺伝地図または物理地図を基準として配列されている請求の範囲7または8に記載のアレイ。

5      10. ターゲットDNAとして、制限酵素処理されたゲノミックDNAが用いられる請求の範囲7ないし9の何れか1項に記載のアレイ。

11. 上記ターゲットDNAが、制限酵素処理された後にサイズ分画されている請求の範囲10に記載のアレイ。

10      12. 上記ポリペプチドとして、タンパク質またはその断片、あるいはオリゴペプチドが用いられる請求の範囲1ないし5の何れか1項に記載のアレイ。

13. 上記タンパク質として、酵素、キナーゼ、抗体、受容体、またはSH3領域を有するタンパク質が用いられる請求の範囲12に記載のアレイ。

14. 上記支持体上に固定化される複数のタンパク質は遺伝地図または物理地図を基準として配列されている請求の範囲12または13に記載のアレイ。

15      15. 上記支持体または小支持体として、無機系材料からなる基板、有機系材料からなる膜、または、ビーズが用いられる請求の範囲1ないし14の何れか1項に記載のアレイ。

20      16. 上記アレイが、マイクロアレイ、マクロアレイ、ビーズアレイまたはプロテインチップの何れかである請求の範囲1ないし15の何れか1項に記載のアレイ。

17. 任意の生物から得られた複数種類の生体物質、または、生体物質と相互作用する合成物質を、支持体上に規則的に配列させて固定化する工程とを含んでおり、

25      上記工程では、固定化される上記生体物質または合成物質を、生体物質に対応する遺伝子を基準として、当該遺伝子が上記生物の染色体にコードされている順序にしたがって配列させるアレイの製造方法。

18. 上記生体物質として、核酸またはポリペプチドが用いられる請求の範囲17に記載のアレイの製造方法。

19. 請求の範囲7ないし11の何れか1項に記載のアレイを用いて、生物を

交雑して得られる雑種から目的の形質を含む染色体断片を同定する遺伝子型の同定方法。

20. 上記生物が、実験用に用いられる動植物である請求の範囲19に記載の遺伝子型の同定方法。

5        21. 請求の範囲20に記載の遺伝子型の同定方法を用いて、ヒトの遺伝子型を同定する遺伝子診断方法。

22. 請求の範囲7ないし11の何れか1項に記載のアレイを用いて、品種改良しようとする生物を交雑して得られる雑種から目的の形質を保持する品種を選抜する選抜方法。

10       23. 上記品種改良しようとする生物が、実験用の動植物、家畜動物または農作物である請求の範囲22に記載の品種改良における選抜方法。

24. 上記農作物が、イネ科植物である請求の範囲23に記載の品種改良における選抜方法。

15       25. 上記イネ科植物が、イネ、コムギ、トウモロコシまたはオオムギである請求の範囲24に記載の品種改良における選抜方法。

26. 請求の範囲7ないし11の何れか1項に記載のアレイを用いて、交雑により得られる雑種個体をハイブリダイズ分析することで得られる、当該雑種個体の網羅的な遺伝子の発現量情報および多型情報を、当該雑種個体の両親の遺伝情報、および、これら個体の属する生物種の遺伝地図と比較し、任意の雑種個体の  
20       遺伝子型が何れの両親に由来するかを判別する遺伝子型由来判別手段と、

遺伝子型由来判別手段から得られる判別結果を複数まとめ、これら判別結果に基づいて、個々の遺伝子型が何れの両親に由来するかを識別可能とするように、染色体ごとに複数の遺伝子型をまとめて表示するための表示用情報を生成する表示用情報生成手段とを備える遺伝子型解析表示システム。

25       27. 請求の範囲7ないし11の何れか1項に記載のアレイを用いるとともに、当該アレイには、任意の生物種の遺伝マーカーが固定化されており、

上記アレイに対して、集団系統ごとに得られる雑種個体から得られるゲノム試料をハイブリダイズさせることで得られる、雑種個体の網羅的な遺伝子の存在情報を、当該雑種個体の属する生物種の遺伝子地図、および、当該生物種で明らか

となっている遺伝マーカー情報と照合し、集団系統ごとに存在する遺伝マーカーを特定する遺伝マーカー特定手段と、

5 同一の雑種個体における任意の表現型を数値化した表現型値が、上記遺伝マーカーと連鎖しているか否かを確認することにより、当該表現型の量的遺伝子座を決定する量的遺伝子座決定手段とを備える量的遺伝子座解析システム。

28. 請求の範囲7ないし11の何れか1項に記載のアレイを用いるとともに、当該アレイには、任意の生物種の遺伝マーカーが固定化されており、

10 上記アレイに対して、集団系統ごとに得られる雑種個体から得られるゲノム試料をハイブリダイズさせることで得られる、雑種個体の網羅的な遺伝子の存在情報を、当該雑種個体の属する生物種の遺伝地図、および、当該生物種で明らかとなっている遺伝マーカー情報と照合し、集団系統ごとに存在する遺伝マーカーを特定する遺伝マーカー特定手段と、

15 特定された遺伝マーカーと上記アレイに固定化されている遺伝マーカーとを照合することにより、当該アレイにおける個々のスポットのハイブリダイゼーション結果を、解析用の遺伝マーカー情報であるスポットマーカー情報として生成するスポットマーカー情報生成手段と、

20 解析対象となる任意の表現型および遺伝子を指定した上で、当該表現型を数値化した表現型値と、同一の雑種個体から得られる発現プロファイル情報に含まれる発現している任意の遺伝子とが、複数のスポットマーカー情報と連鎖しているか否かを確認することにより、上記任意の表現型の遺伝要因を規定する遺伝要因規定手段とを備える遺伝子相互作用解析システム。

25 29. 交雑により得られる雑種個体を核酸アレイによりハイブリダイズ分析することで得られる、当該雑種個体の網羅的な遺伝子の発現量情報および多型情報を、当該雑種個体の両親の遺伝情報、および、これら個体の属する生物種の遺伝地図と比較し、任意の雑種個体の遺伝子型が何れの両親に由来するかを判別する遺伝子型由来判別手段と、

遺伝子型由来判別手段から得られる判別結果を複数まとめ、これら判別結果に基づいて、個々の遺伝子型が何れの両親に由来するかを識別可能とするように、染色体ごとに複数の遺伝子型をまとめて表示するための表示用情報を生成する表

示用情報生成手段とを備える遺伝子型解析表示システム。

30. 上記核酸アレイとして、当該核酸アレイに固定されている複数の核酸分子が、当該核酸分子に対応するそれぞれの塩基配列のブロックが染色体上に並んでいる順序が確認可能に配列されている染色体座位確認可能アレイが用いられる請求の範囲29に記載の遺伝子型解析表示システム。

31. さらに、遺伝地図作成情報に基づき、上記雑種個体の属する生物種の遺伝地図を作成する遺伝地図作成手段を備える請求の範囲29または30に記載の遺伝子型解析表示システム。

32. 上記遺伝地図作成情報として、少なくとも、当該生物種で知られている遺伝子および／または遺伝マーカーの名称と、当該遺伝子および／またはマーカーの染色体上の座乗位置とが用いられる請求の範囲31に記載の遺伝子型解析表示システム。

33. 上記遺伝子型由来判別手段は、任意の遺伝子型を、何れかの両親型、ヘテロ型、または判別不能の何れかに判別し、これを判別結果として生成する請求の範囲29ないし32の何れか1項に記載の遺伝子型解析表示システム。

34. 上記遺伝子型由来判別手段は、両親の遺伝情報として、両親の遺伝子型情報および／または遺伝子発現プロファイル情報を用いる請求の範囲29ないし32の何れか1項に記載の遺伝子型解析表示システム。

35. 上記表示用情報生成手段は、さらに、染色体別の組換え数、および組換え頻度の少なくとも一方を表示用情報に含めて生成する請求の範囲29ないし34の何れか1項に記載の遺伝子型解析表示システム。

36. 上記表示用情報生成手段は、表示色または表示パターンを変えることにより任意の遺伝子型の由来を識別可能に表示するよう表示用情報を生成する請求の範囲29ないし35の何れか1項に記載の遺伝子型解析表示システム。

37. さらに、入力手段および出力手段の少なくとも一方を備える請求の範囲29ないし36の何れか1項に記載の遺伝子型解析表示システム。

38. 上記入力手段は、上記雑種個体の網羅的な遺伝子の発現量情報、および、両親の遺伝情報の少なくとも何れかを入力可能とする請求の範囲37に記載の遺伝子型解析表示システム。

39. 上記入力手段は、さらに、遺伝地図作成情報を入力可能とする請求の範囲38に記載の遺伝子型解析表示システム。

40. 上記入力手段として、核酸アレイを用いたハイブリダイゼーションの結果を画像情報として読み取ることができる画像読取手段を備えているとともに、

得られた画像情報から遺伝子の発現量を解析し、網羅的な遺伝子の発現量情報を生成する画像情報処理手段を備えている請求の範囲37ないし39の何れか1項に記載の遺伝子型解析表示システム。

41. さらに、上記入力手段として、上記雑種個体の網羅的な遺伝子の発現量情報、両親の遺伝情報、および遺伝地図作成情報の少なくとも何れかを修正可能とする手動入力手段を備えている請求の範囲37ないし40の何れか1項に記載の遺伝子型解析表示システム。

42. 上記出力手段として、表示用情報を画面上で表示する画像表示手段、および、表示用情報を印刷する印刷手段の少なくとも何れかを備えている請求の範囲37ないし41の何れか1項に記載の遺伝子型解析表示システム。

43. 上記入力手段および出力手段として、外部の装置との間で情報の入出力を可能とする外部情報入出力手段を備えている請求の範囲37ないし41の何れか1項に記載の遺伝子型解析表示システム。

44. 上記核酸アレイとして、固定化される核酸がDNAであるDNAアレイが用いられる請求の範囲29ないし43の何れか1項に記載の遺伝子型解析表示システム。

45. 上記DNAアレイに固定化されるDNAとして、遺伝マーカー、ゲノムDNA、制限酵素処理したゲノムDNA、cDNA、EST、または合成オリゴDNAが用いられる請求の範囲44に記載の遺伝子型解析表示システム。

46. 上記核酸アレイが、マイクロアレイ、マクロアレイ、またはビーズアレイである請求の範囲29ないし45の何れか1項に記載の遺伝子型解析表示システム。

47. 請求の範囲29ないし46の何れか1項に記載の遺伝子型解析表示システムを用いて、生物を交雑して得られる雑種から目的の形質を含む染色体断片を

同定することを特徴とする遺伝子型の同定方法。

48. 上記生物が、実験用に用いられる動植物である請求の範囲47に記載の遺伝子型の同定方法。

49. 請求の範囲29ないし46の何れか1項に記載の遺伝子型解析表示システムを用いて、品種改良しようとする生物を交雑して得られる雑種から目的の形質を保持する品種を選抜する品種改良における選抜方法。

50. 上記品種改良しようとする生物が、実験用の動植物、家畜動物または農作物である請求の範囲49に記載の品種改良における選抜方法。

51. 任意の生物種の遺伝マーカーを固定化した核酸アレイに対して、集団系統ごとに得られる雑種個体から得られるゲノム試料をハイブリダイズさせることで得られる、雑種個体の網羅的な遺伝子の存在情報を、当該雑種個体の属する生物種の遺伝子地図、および、当該生物種で明らかとなっている遺伝マーカー情報と照合し、集団系統ごとに存在する遺伝マーカーを特定する遺伝マーカー特定手段と、

同一の雑種個体における任意の表現型を数値化した表現型値が、上記遺伝マーカーと連鎖しているか否かを確認することにより、当該表現型の量的遺伝子座を決定する量的遺伝子座決定手段とを備える量的遺伝子座解析システム。

52. 上記核酸アレイとして、当該核酸アレイに固定されている複数の核酸分子が、当該核酸分子に対応するそれぞれの塩基配列のブロックが染色体上に並んでいる順序が確認可能に配列されている染色体座位確認可能アレイが用いられる請求の範囲51に記載の量的遺伝子座解析システム。

53. さらに、遺伝地図作成情報に基づき、上記雑種個体の属する生物種の遺伝地図を作成する遺伝地図作成手段を備える請求の範囲51または52に記載の量的遺伝子座解析システム。

54. 上記遺伝地図作成情報として、少なくとも、当該生物種で知られている遺伝子および／または遺伝マーカーの名称と、当該遺伝子および／またはマーカーの染色体上の座乗位置とが用いられる請求の範囲53に記載の量的遺伝子座解析システム。

55. 上記遺伝マーカー特定手段で用いられる遺伝マーカー情報は、多型を有

する遺伝マーカーである請求の範囲 5 1 ないし 5 4 の何れか 1 項に記載の量的遺伝子座解析システム。

5 6. 上記遺伝マーカーが SNP または RFLP である請求の範囲 5 5 に記載の量的遺伝子座解析システム。

5 5 5 7. 上記量的遺伝子座決定手段では、インターバルマッピングを行うことにより、上記表現型の量的遺伝子座を決定する請求の範囲 5 1 ないし 5 6 の何れか 1 項に記載の量的遺伝子座解析システム。

5 8. さらに、核酸アレイを用いたハイブリダイゼーションの結果を画像情報として読み取ることを可能とする画像読取手段を備えているとともに、

10 得られた画像情報を解析し、網羅的な遺伝子の存在情報を生成する画像情報処理手段を備えている請求の範囲 5 1 ないし 5 7 の何れか 1 項に記載の量的遺伝子座解析システム。

5 9. さらに、入力手段および出力手段の少なくとも一方を備える請求の範囲 5 1 ないし 5 7 の何れか 1 項に記載の量的遺伝子座解析システム。

15 6 0. 上記入力手段は、上記遺伝マーカー情報および上記表現型値の少なくとも一方を入力可能とする請求の範囲 5 9 に記載の量的遺伝子座解析システム。

6 1. 上記入力手段は、さらに、遺伝地図および遺伝地図作成情報の少なくとも一方を入力可能とする請求の範囲 6 0 に記載の量的遺伝子座解析システム。

20 6 2. さらに、上記入力手段として、上記雑種個体の網羅的な遺伝子の存在情報、遺伝マーカー情報、および遺伝地図作成情報の少なくとも何れかを修正可能とする手動入力手段を備えている請求の範囲 5 9 ないし 6 1 の何れか 1 項に記載の量的遺伝子座解析システム。

25 6 3. 上記出力手段として、解析結果を画面上で表示する画像表示手段、および、解析結果を印刷する印刷手段の少なくとも何れかを備えている請求の範囲 5 9 ないし 6 2 の何れか 1 項に記載の量的遺伝子座解析システム。

6 4. 上記入力手段および出力手段として、外部の装置との間で情報の入出力を可能とする外部情報入出力手段を備えている請求の範囲 5 9 ないし 6 3 の何れか 1 項に記載の量的遺伝子座解析システム。

6 5. 上記核酸アレイとして、固定化される核酸が DNA である DNA アレイ

が用いられる請求の範囲 5 1 ないし 6 4 の何れか 1 項に記載の量的遺伝子座解析システム。

6 6. 上記核酸アレイが、マイクロアレイ、マクロアレイ、またはビーズアレイである請求の範囲 5 1 ないし 6 5 の何れか 1 項に記載の量的遺伝子座解析システム。

6 7. 請求の範囲 5 1 ないし 6 6 の何れか 1 項に記載の量的遺伝子座解析システムを用いて、生物の量的形質を解析する量的形質解析方法。

6 8. 請求の範囲 5 1 ないし 6 6 の何れか 1 項に記載の量的遺伝子座解析システムを用いて、任意の形質の発現に関与する遺伝子を探索する遺伝子探索方法。

6 9. 請求の範囲 5 1 ないし 6 6 の何れか 1 項に記載の量的遺伝子座解析システムを用いる生物の品種改良方法。

7 0. 上記品種改良しようとする生物が、実験用の動植物、家畜動物または農作物である請求の範囲 6 9 に記載の品種改良方法。

7 1. 任意の生物種の遺伝マーカーを固定化した核酸アレイに対して、集団系統ごとに得られる雑種個体から得られるゲノム試料をハイブリダイズさせることで得られる、雑種個体の網羅的な遺伝子の存在情報を、当該雑種個体の属する生物種の遺伝地図、および、当該生物種で明らかとなっている遺伝マーカー情報と照合し、集団系統ごとに存在する遺伝マーカーを特定する遺伝マーカー特定手段と、

特定された遺伝マーカーと上記核酸アレイに固定化されている遺伝マーカーとを照合することにより、核酸アレイにおける個々のスポットのハイブリダイゼーション結果を、解析用の遺伝マーカー情報であるスポットマーカー情報として生成するスポットマーカー情報生成手段と、

解析対象となる任意の表現型および遺伝子を指定した上で、当該表現型を数値化した表現型値と、同一の雑種個体から得られる発現プロファイル情報に含まれる発現している任意の遺伝子とが、複数のスポットマーカー情報と連鎖しているか否かを確認することにより、上記任意の表現型の遺伝要因を規定する遺伝要因規定手段とを備える遺伝子相互作用解析システム。

7 2. 上記核酸アレイとして、当該核酸アレイに固定されている複数の核酸分



子が、当該核酸分子に対応するそれぞれの塩基配列のブロックが染色体上に並んでいる順序が確認可能に配列されている染色体座位確認可能アレイが用いられる請求項 70 に記載の遺伝子相互作用解析システム。

5 73. さらに、遺伝地図作成情報に基づき、上記雑種個体の属する生物種の遺伝地図を作成する遺伝地図作成手段を備える請求の範囲 71 または 72 に記載の遺伝子相互作用解析システム。

10 74. 上記遺伝地図作成情報として、少なくとも、当該生物種で知られている遺伝子および／または遺伝マーカーの名称と、当該遺伝子および／またはマーカーの染色体上の座乗位置とが用いられる請求の範囲 73 に記載の遺伝子相互作用解析システム。

75. 上記遺伝マーカー特定手段で用いられる遺伝マーカー情報は、多型を有する遺伝マーカーである請求の範囲 71 ないし 74 の何れか 1 項に記載の遺伝子相互作用解析システム。

15 76. 上記遺伝マーカーが SNP または RFLP である請求の範囲 75 に記載の遺伝子相互作用解析システム。

77. 上記スポットマーカー情報生成手段では、ハイブリダイゼーションにより存在が明らかとなった遺伝マーカーのスポットのみを、スポットマーカー情報として生成する請求項 71 ないし 76 の何れか 1 項に記載の遺伝子相互作用解析システム。

20 78. 上記スポットマーカー情報生成手段では、遺伝マーカーが核酸アレイに固定化されている位置情報もスポットマーカー情報に含めて生成する請求項 77 に記載の遺伝子相互作用解析システム。

25 79. さらに、同一の雑種個体から得られる網羅的な遺伝子の発現量について発現プロファイル解析することにより、当該雑種個体の発現プロファイル情報を生成する発現プロファイル情報生成手段を備える請求の範囲 71 ないし 78 の何れか 1 項に記載の遺伝子相互作用解析システム。

80. 上記発現プロファイル情報生成手段では、マイクロアレイ、マクロアレイ、ビーズアレイおよびディファレンシャルディスプレイの少なくとも何れかを用いて、遺伝子発現を網羅的に測定し、上記雑種個体の発現プロファイル情報を

生成する請求の範囲79に記載の遺伝子相互作用解析システム。

81. 上記発現プロファイル情報生成手段では、雑種個体の網羅的な遺伝子の存在情報を得るために用いられた核酸アレイあるいは同一のサンプルがスポットされた核酸アレイを用いて発現プロファイル情報を生成する請求の範囲80に記載の遺伝子相互作用解析システム。

82. 上記核酸アレイとして、固定化される核酸がDNAであるDNAアレイが用いられる請求の範囲71ないし81の何れか1項に記載の遺伝子相互作用解析システム。

83. 上記核酸アレイが、マイクロアレイ、マクロアレイ、またはビーズアレイである請求の範囲71ないし82の何れか1項に記載の遺伝子相互作用解析システム。

84. 上記遺伝要因規定手段では、インターバルマッピングを行って得られた遺伝マーカー間の量的遺伝子座 (QTL) により、上記任意の表現型の遺伝要因を規定する請求の範囲71ないし83の何れか1項に記載の遺伝子相互作用解析システム。

85. 上記遺伝要因規定手段では、さらに、表現型の遺伝要因を規定する情報として、当該遺伝マーカーに関わる遺伝子の発現量を用いる請求の範囲84に記載の遺伝子相互作用解析システム。

86. さらに、入力手段および出力手段の少なくとも一方を備える請求の範囲71ないし85の何れか1項に記載の遺伝子相互作用解析システム。

87. 上記入力手段は、上記雑種個体の網羅的な遺伝子の存在情報、上記遺伝マーカー情報、上記表現型値、および発現プロファイル情報の少なくとも何れかを入力可能とする請求の範囲86に記載の遺伝子相互作用解析システム。

88. 上記入力手段は、さらに、遺伝地図および遺伝地図作成情報の少なくとも一方を入力可能とする請求の範囲87に記載の遺伝子相互作用解析システム。

89. 上記入力手段として、核酸アレイを用いたハイブリダイゼーションの結果を画像情報として読み取ることを可能とする画像読取手段を備えているとともに、

得られた画像情報から遺伝子の発現量を解析し、網羅的な遺伝子の発現量情報

を生成する画像情報処理手段を備えている請求の範囲 86 ないし 88 の何れか 1 項に記載の遺伝子相互作用解析システム。

5 90. 上記発現プロファイル情報を入力可能とする入力手段として、上記画像情報読取手段が用いられる請求の範囲 89 に記載の遺伝子相互作用解析システム。

91. さらに、上記入力手段として、上記雑種個体の網羅的な遺伝子の存在情報、遺伝マーカー情報、および遺伝地図作成情報の少なくとも何れかを修正可能とする手動入力手段を備えている請求の範囲 86 ないし 90 の何れか 1 項に記載の遺伝子相互作用解析システム。

10 92. 上記出力手段として、解析結果を画面上で表示する画像表示手段、および、解析結果を印刷する印刷手段の少なくとも何れかを備えている請求の範囲 86 ないし 91 の何れか 1 項に記載の遺伝子相互作用解析システム。

15 93. 上記入力手段および出力手段として、外部の装置との間で情報の入出力を可能とする外部情報入出力手段を備えている請求の範囲 86 ないし 92 の何れか 1 項に記載の遺伝子相互作用解析システム。

94. 請求の範囲 71 ないし 93 の何れか 1 項に記載の遺伝子相互作用解析システムを用いて、複数の遺伝子間の相互作用を解析する遺伝子相互作用解析方法。

20 95. 請求の範囲 71 ないし 93 の何れか 1 項に記載の遺伝子相互作用解析システムを用いて、任意の形質の発現に関与する遺伝子を探索する遺伝子探索方法。

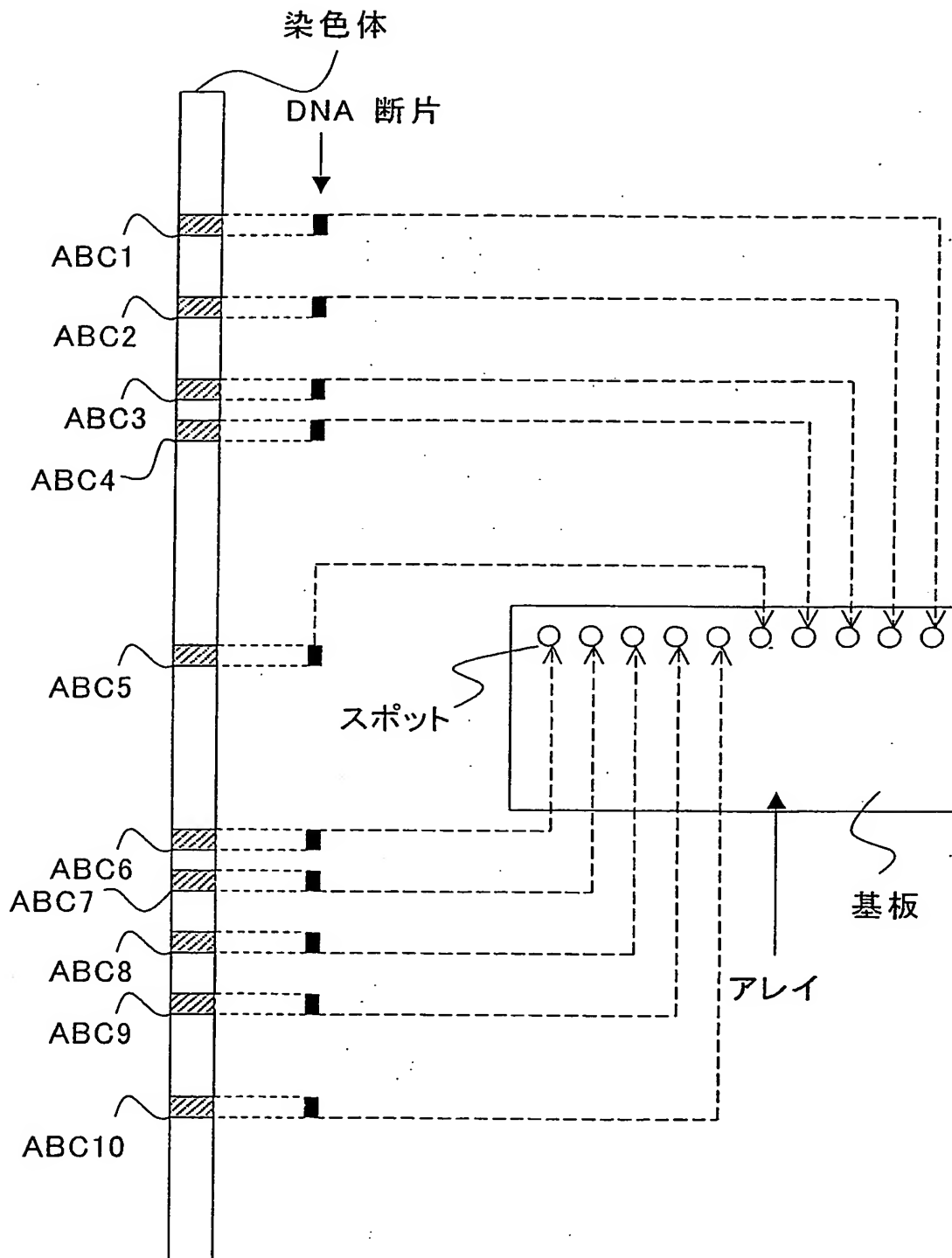
96. 請求の範囲 71 ないし 93 の何れか 1 項に記載の遺伝子相互作用解析システムを用いる生物の品種改良方法。

25 97. 上記品種改良しようとする生物が、実験用の動植物、家畜動物または農作物である請求の範囲 96 に記載の品種改良方法。

**This Page Blank (uspto)**

1 / 13

図 1



This Page Blank (uspto)

2/13

図2(a)

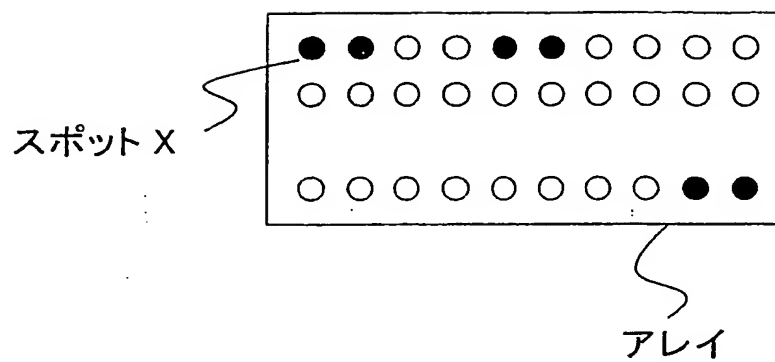
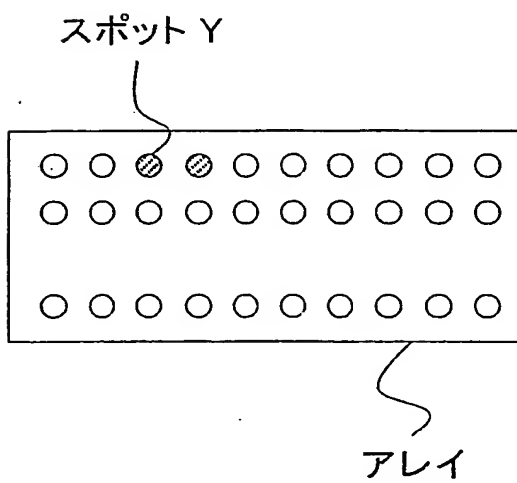


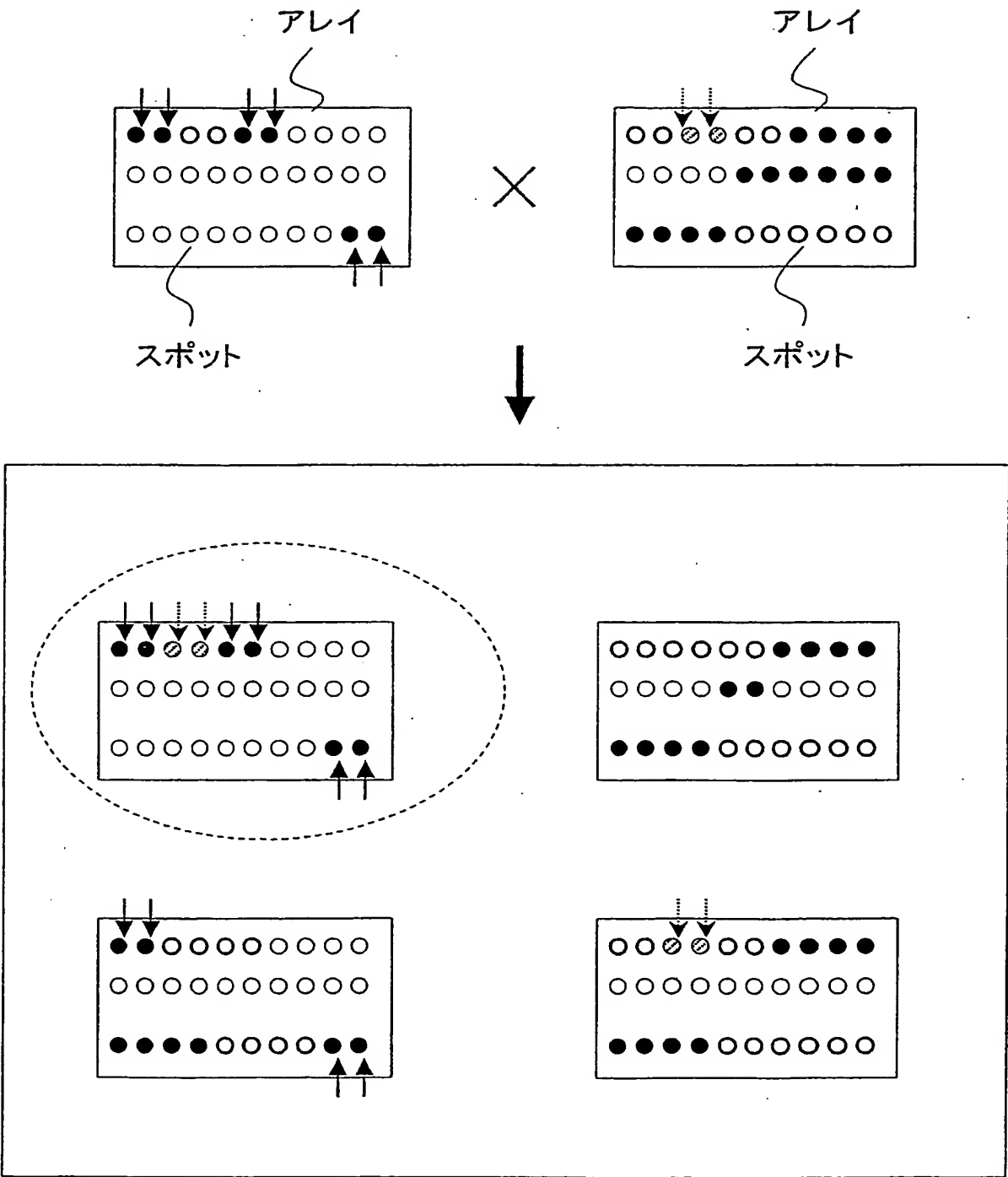
図2(b)



**This Page Blank (uspto)**



図 3

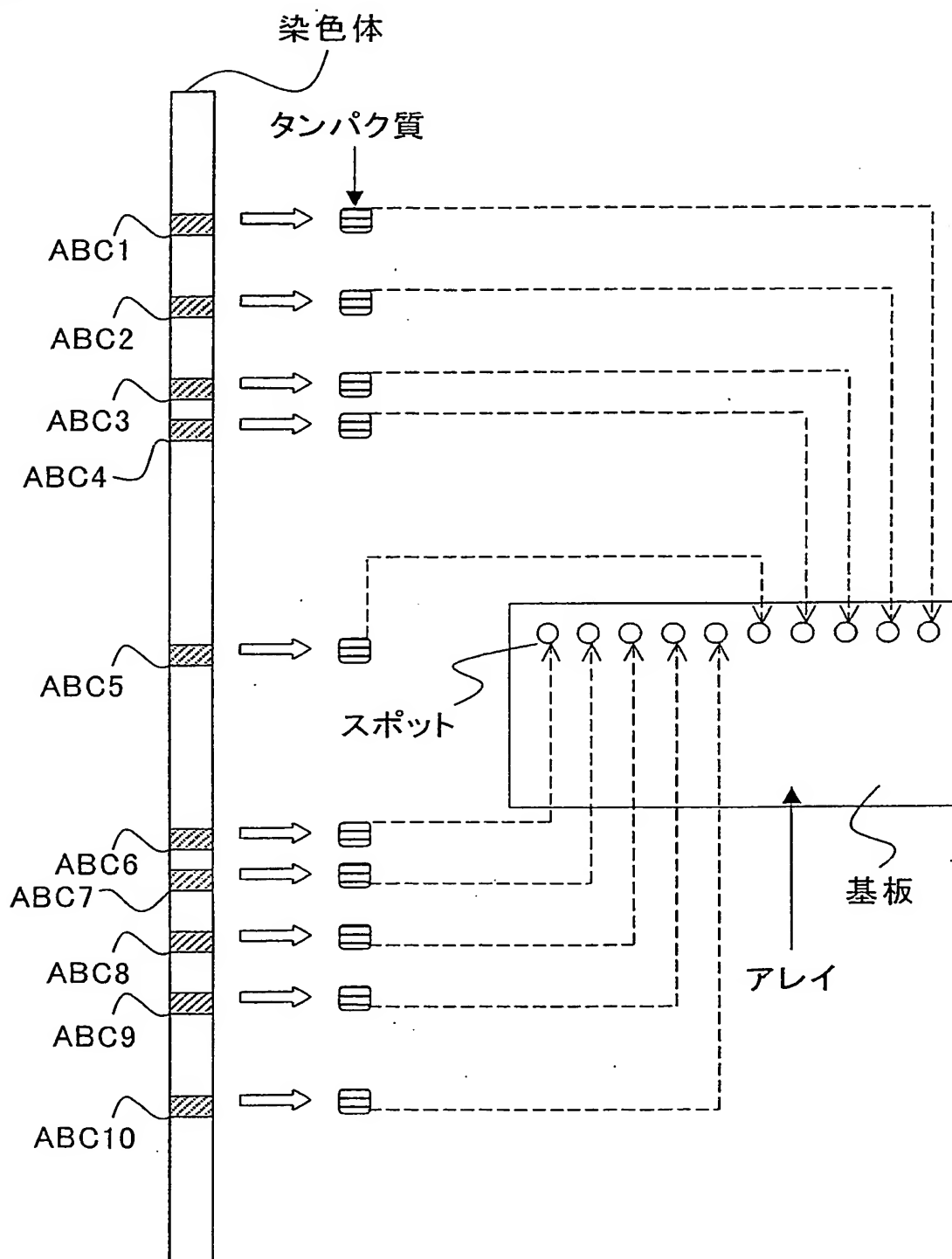


2003-01-01 0672003

This Page Blank (uspto)

4/13

図4

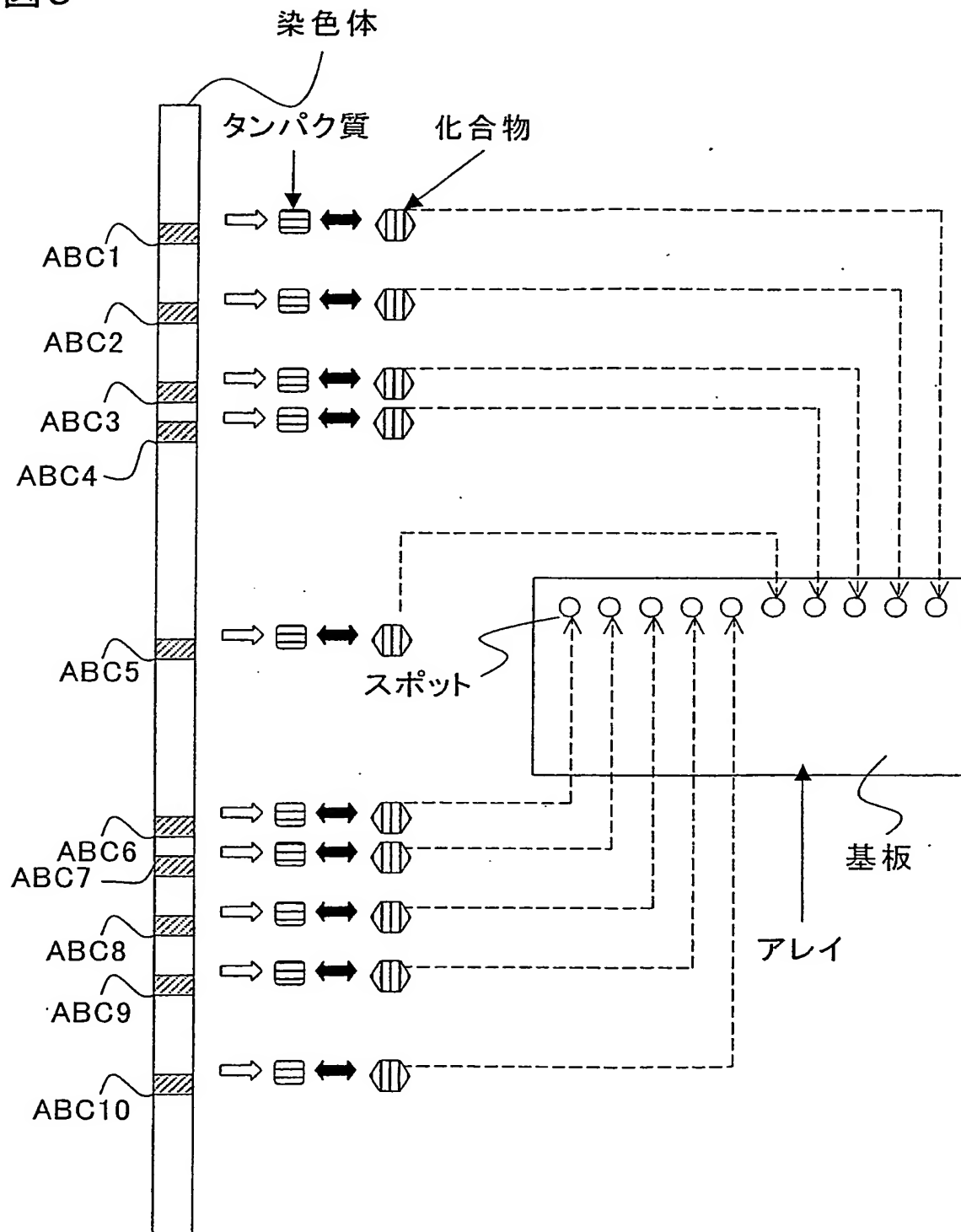


1020 Rec'd CPST/PL 31 OCT 2005

This Page Blank (uspto)

5/13

図5

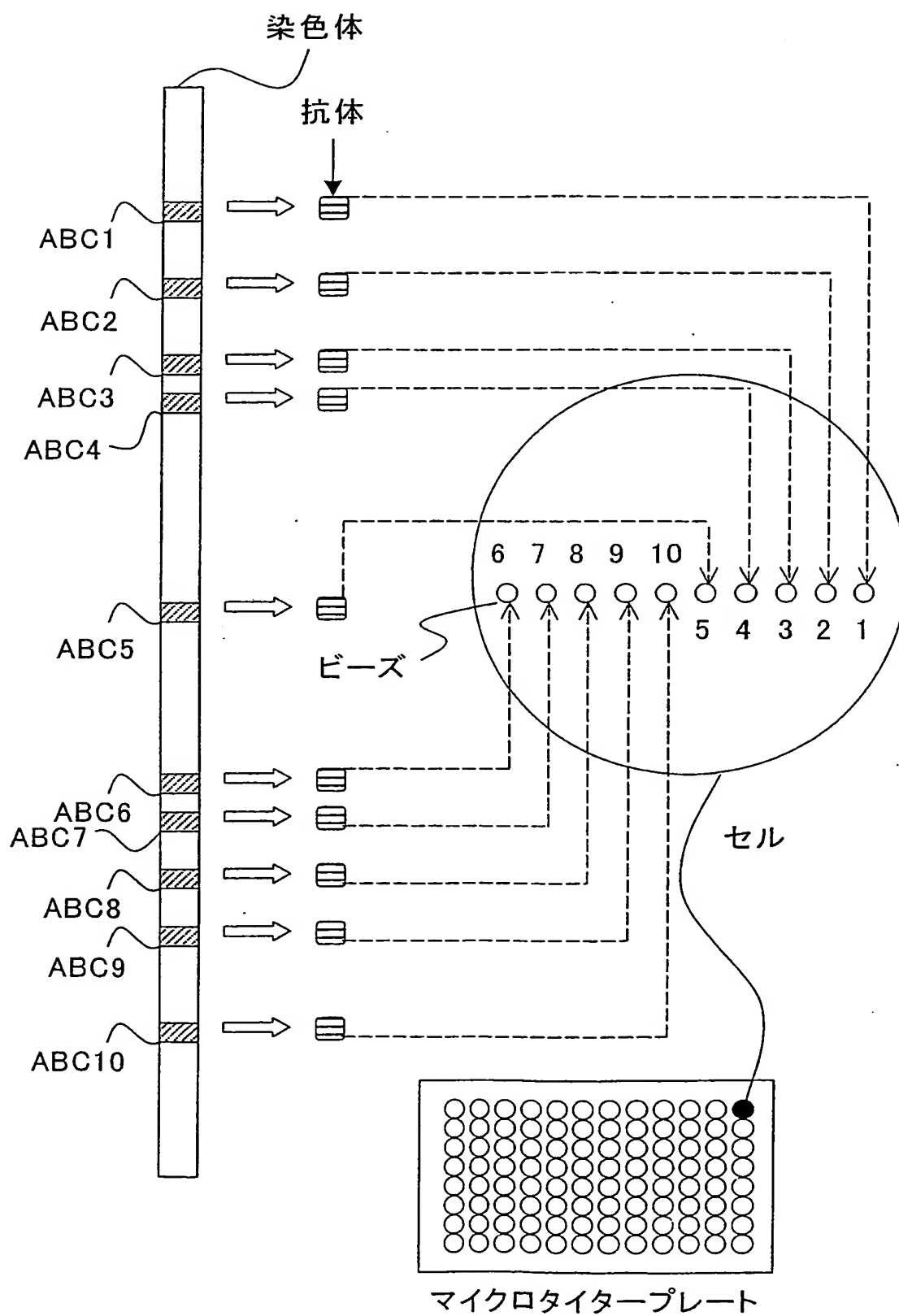


JC20 Rec'd PCT/PTO 31 OCT 2003

This Page Blank (uspto)

6/13

図6

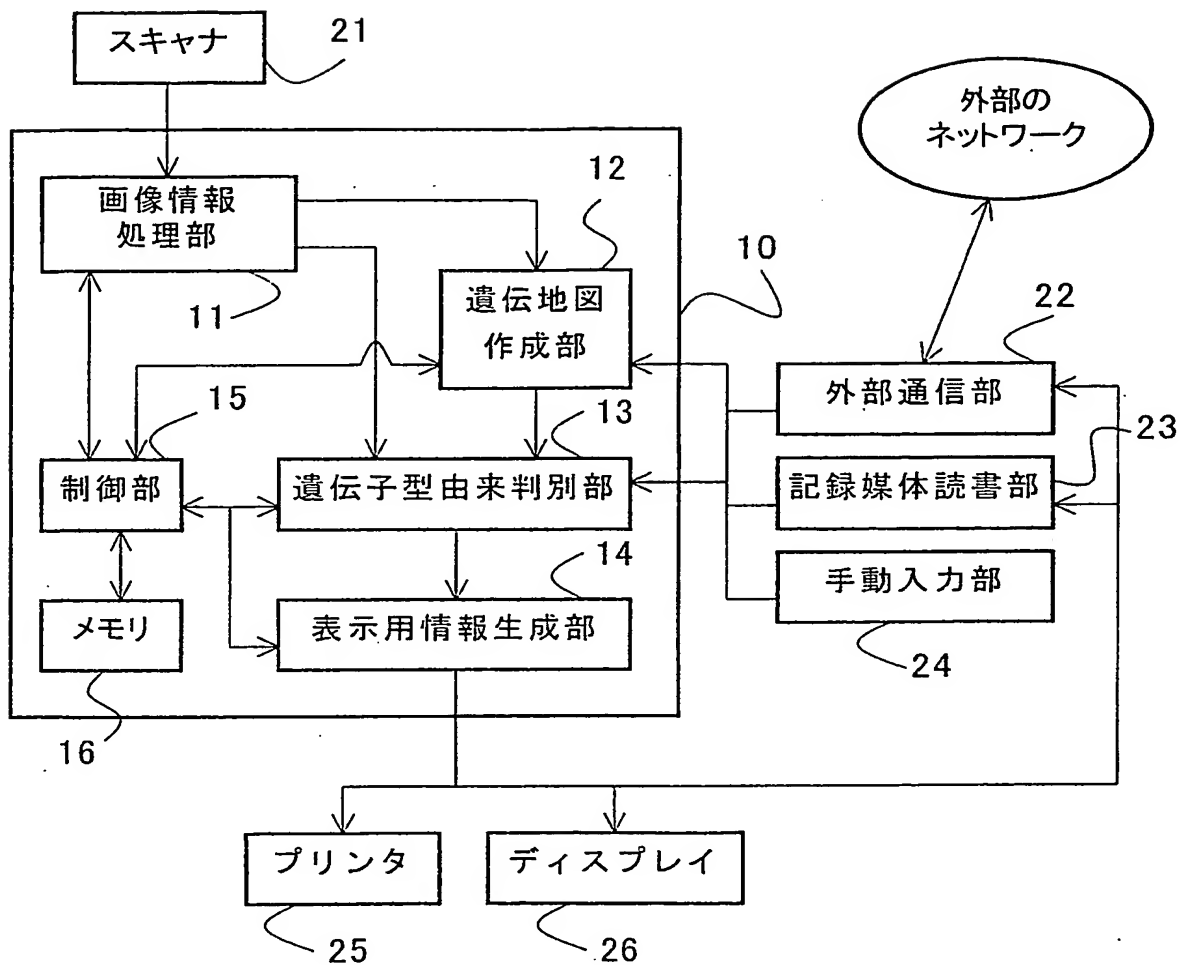


This Page Blank (uspto)



7/13

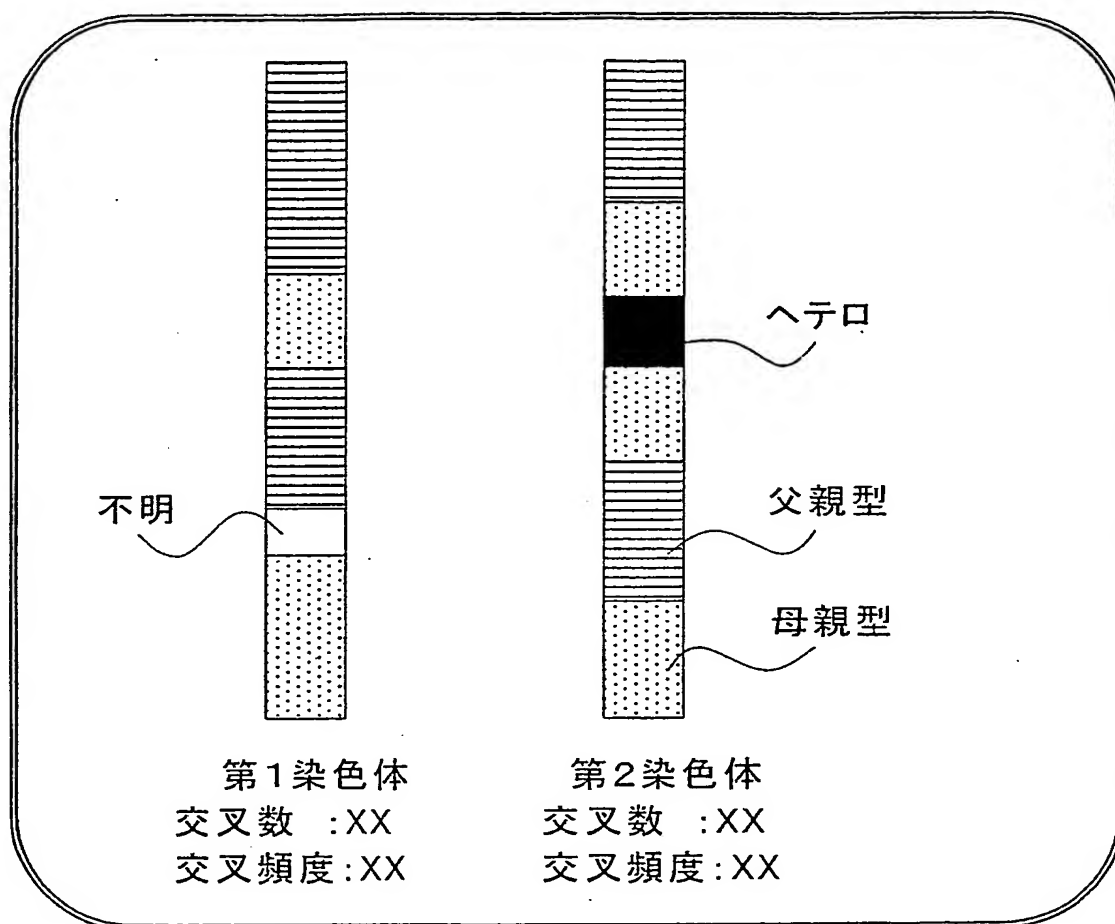
図7



This Page Blank (uspto)

8/13

図8

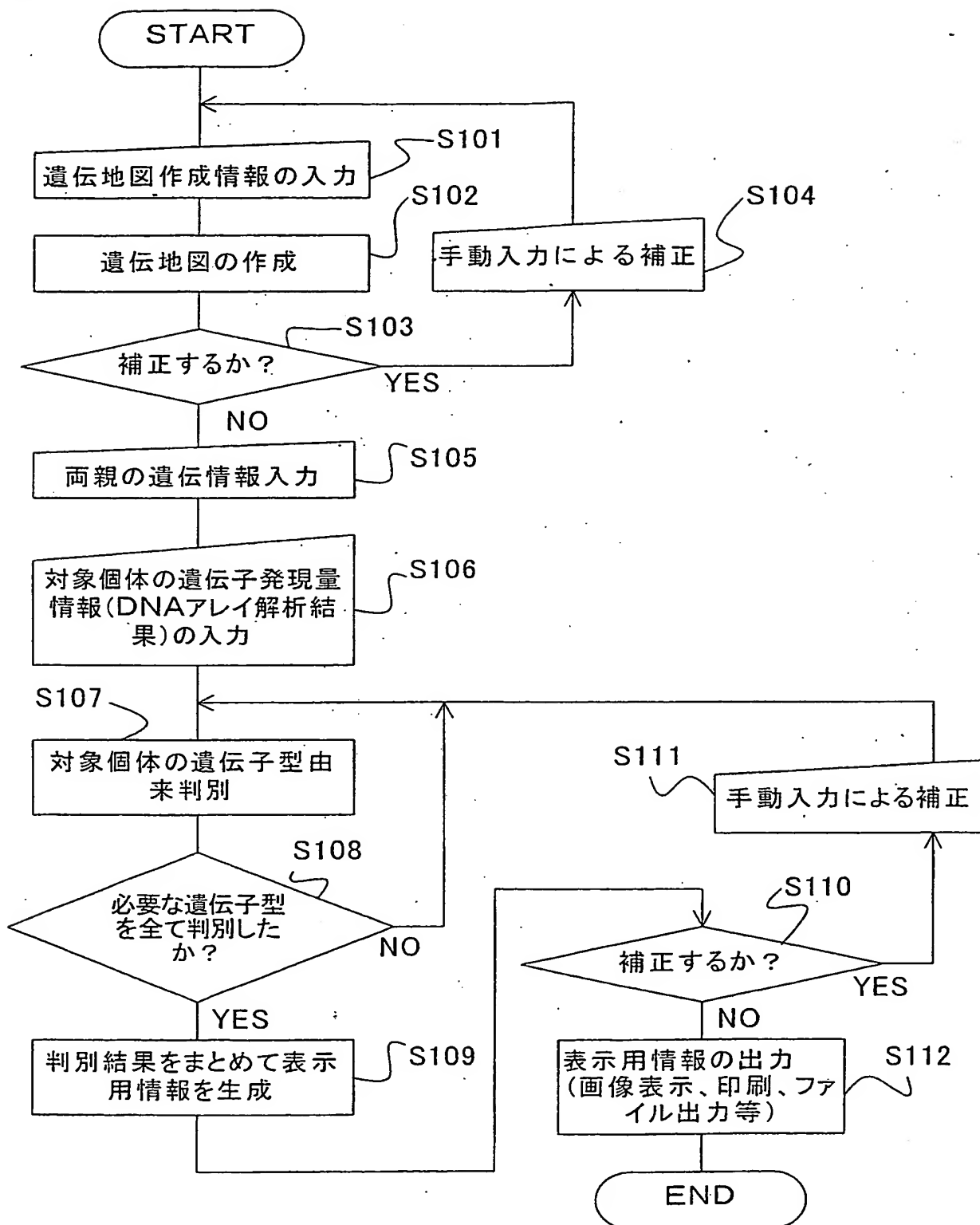


JC20 Rec'd PGT/PTO 31 OCT 2005

This Page Blank (uspto)

9/13

図9

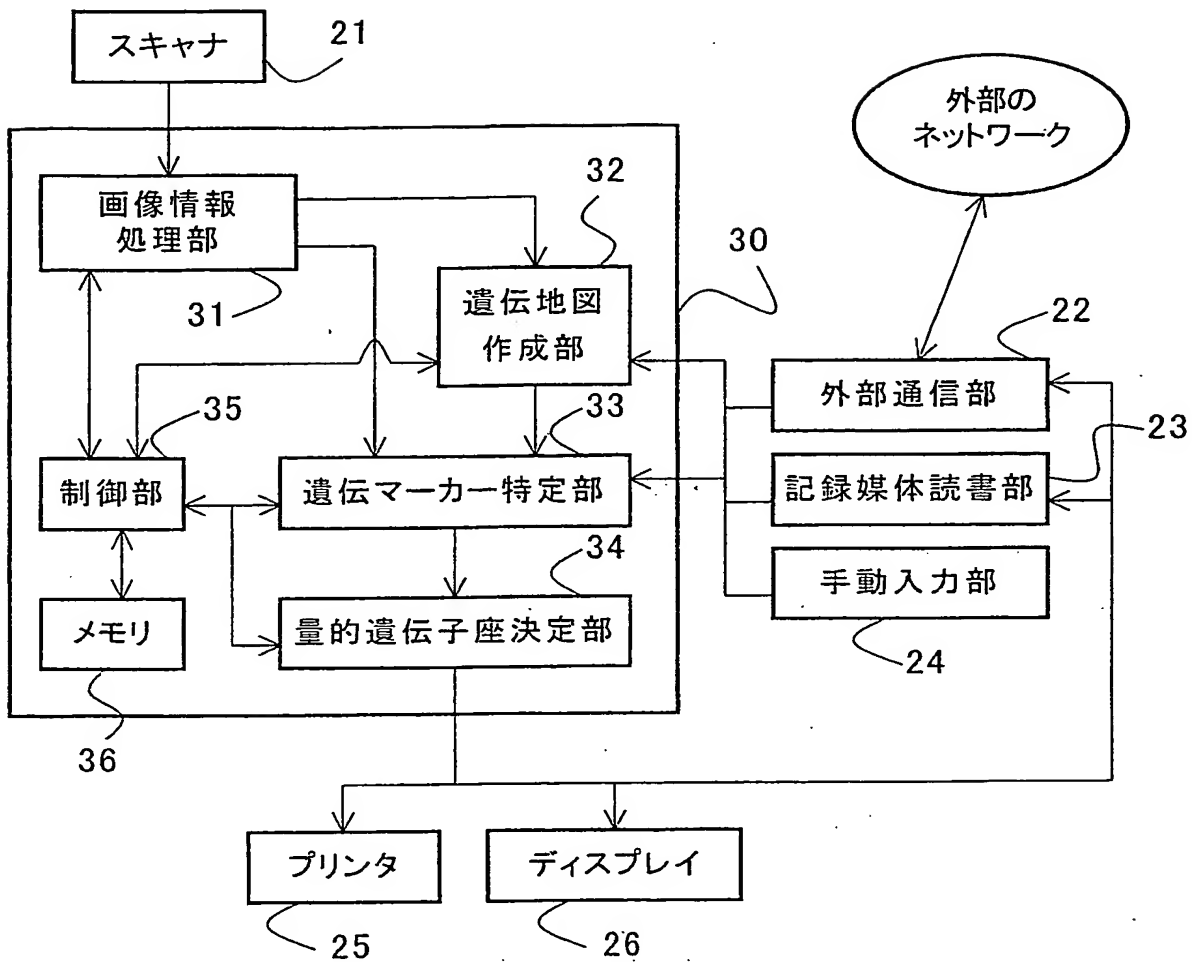


JC20 Rec'd PCT/PTO 31 OCT 2005

This Page Blank (uspto)

10/13

図 10



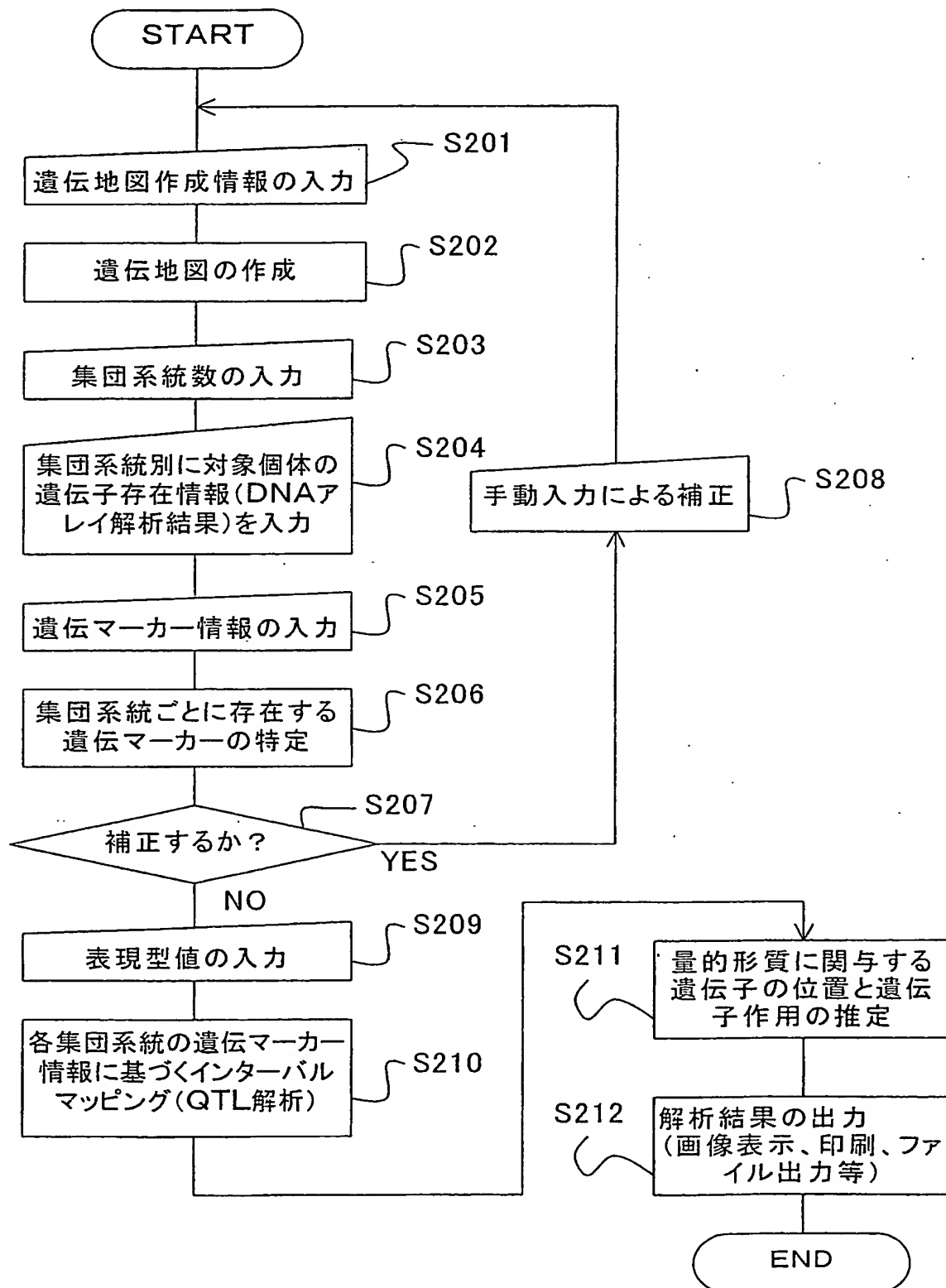
10 OCT 2009

**This Page Blank (uspto)**



11/13

図11

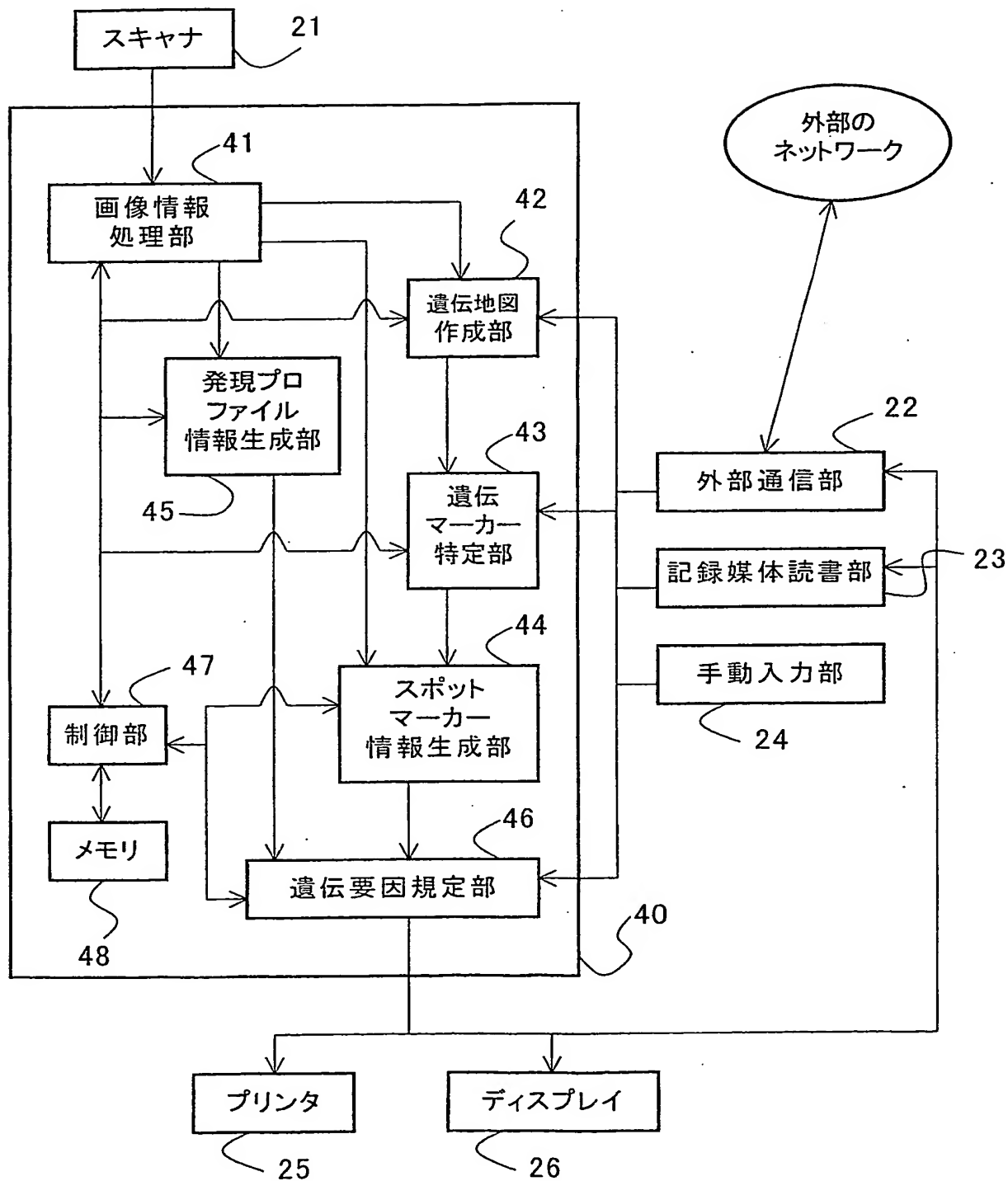


USPTO Form 1-100 (Rev. 10-1-2000)

**This Page Blank (uspto)**

12/13

図12

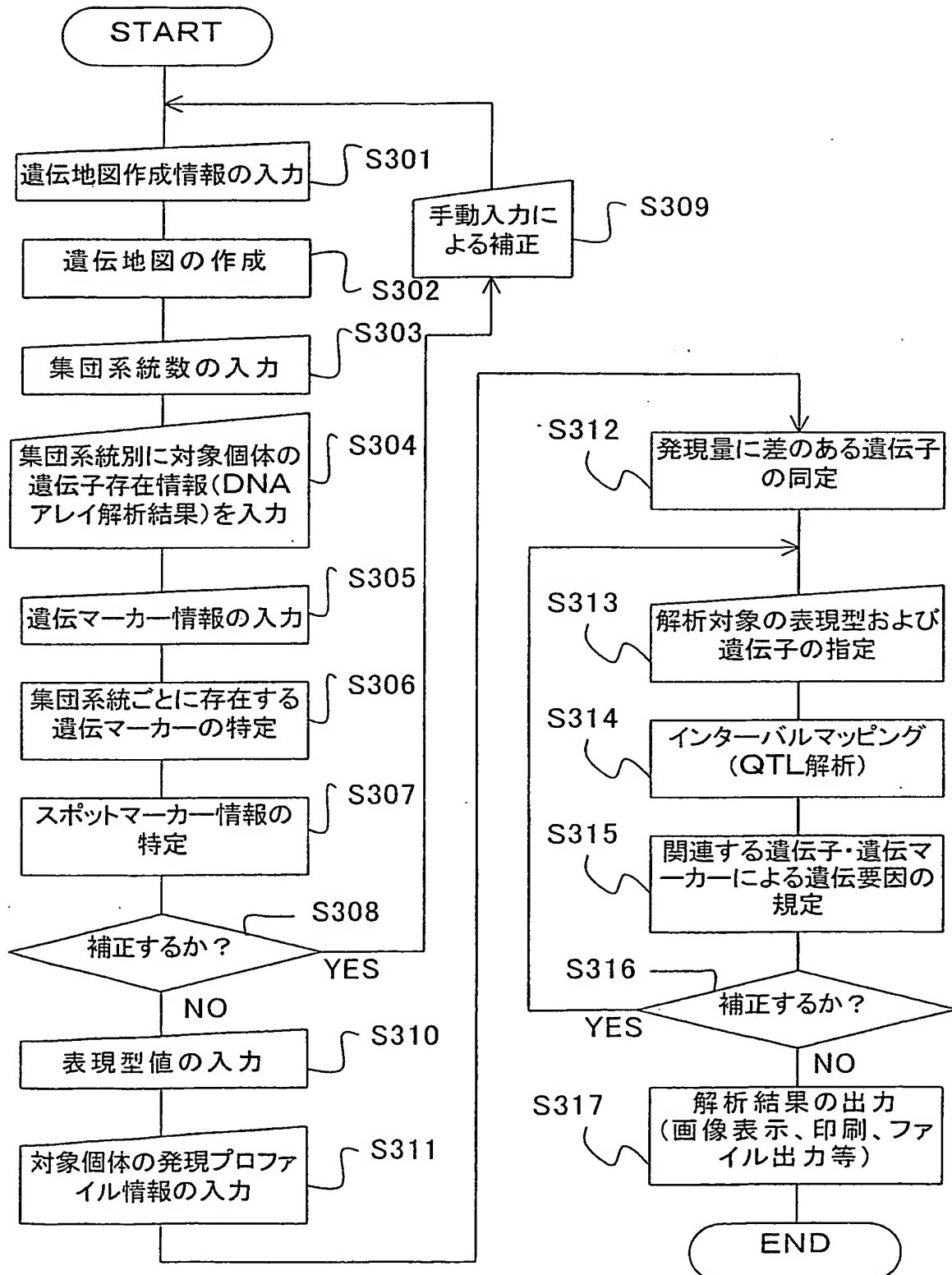


JG20 REGISTRATION 31 OCT 2003

**This Page Blank (uspto)**

13/13

図13



JC20 Rec'd P&A/PTO 31 OCT 2005

This Page Blank (uspto)

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>7</sup> C12N15/00, C12Q1/68, A01H1/00, A01K67/00, A61D19/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>7</sup> C12N15/00, C12Q1/68, A01H1/00, A01K67/00, A61D19/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPIDS/BIOSIS/BIOTECHABS/MEDLINE/CA (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	林崎良英監修, 大規模ゲノム解析技術とポストシーケンス時代の遺伝子機能解析 基本テクニックからバイオインフォマティクス、マイクロアレイまで, 2001年, 株式会社中山書店, p. 213-221	1, 2, 4, 6-18, 28, 71-97
Y		3, 5, 19, 20, 22 -27, 29-70
Y A	Dunbar A. S. et al., Application of the Luminex LabMAP in rapid screening for mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene: A pilot study, Clinical Chemistry, 2000, Vol. 46, p. 1498-1500	3, 5 1, 2, 4, 6-20, 22-97

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの  
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 6 . 0 8 . 2 0 0 4

国際調査報告の発送日

24. 8. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

深草 亜子

4 B

9 5 4 8

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (2004年1月)



## 第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 21 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
  
人体の診断方法 である。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-97に記載されている国際出願の発明の数は4である。

請求項29-50、51-70、71-97に係る発明は、請求項1に係る発明と、アレイを用いるという点においてのみ共通する。しかしながら、アレイを用いることは公知の事項であるから、当該事項はPCT規則13.2の第2文の意味において特別な技術的特徴ではない。よってこれらの発明は、一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係にないから、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page Blank (uspto)**

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/006284

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/00, C12Q1/68, A01H1/00, A01K67/00, A61D19/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/00, C12Q1/68, A01H1/00, A01K67/00, A61D19/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPIDS/BIOSIS/BIOTECHABS/MEDLINE/CA (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> Y	Supervised by Yoshihide HAYASHIZAKI, "Daikibo Genome Kaiseki Gijutsu to Post Sequence Jidai no Idenshi Kino Kaiseki Kihon Technique Kara Bio Informatics, Micro Array Made", 2001 Nen, Nakayama-Shoten Co., Ltd., pages 213 to 221	1, 2, 4, 6-18, 28, 71-97 3, 5, 19, 20, 22-27, 29-70
<u>Y</u> <u>A</u>	Dunbar A.S. et al., Application of the Luminex LabMAP in rapid screening for mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene: A pilot study, Clinical Chemistry, 2000, Vol.46, pages 1498 to 1500	3, 5 1, 2, 4, 6-20, 22-97

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
06 August, 2004 (06.08.04)Date of mailing of the international search report  
24 August, 2004 (24.08.04)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/006284

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>Y</u> <u>A</u>	JP 2002-291474 A (Japan Science and Technology Corp.), 08 October, 2002 (08.10.02), Par. Nos. [0012], [0014], [0041] (Family: none)	<u>19,20,22-25</u> 1-18,26-97
<u>Y</u> <u>A</u>	Supervised by Takuji SASAKI et al., Cell Technology separate volume, Shokubutsu Saibo Kogaku Series 14, "Shokubutsu no Genome Kenkyu Protocol Saishin no Genome Joho to sono Riyoho", 2001 Nen, Shujunsha Co., Ltd., page 114	<u>26,29-50</u> 1-20,22-25, 27,28,51-97
<u>Y</u> <u>A</u>	Steinmetz L.M. et al., Disecting the architecture of a quantitative trait locus in yeast, Nature, 2002, Vol.416, pages 326 to 330	<u>27,51-70</u> 1-20,22-26, 28-50,71-97

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/006284

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claim No.: 21  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
The invention relates to a method of diagnosing a human body.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The number of inventions claimed in claims 1-97 in this international application is 4.

The inventions of claims 29-50, claims 51-70 and claims 71-97 are common to the invention of claim 1 only in the use of an array. However, since the use of an array is publicly known, this matter is not "special technical features within the meaning of PCT Rule 13.2, second sentence. Thus, among these inventions, there is no technical relationship involving one or more of the same or corresponding special technical features. Consequently, it cannot be recognized that these inventions are so linked as to form a single general inventive concept.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**This Page Blank (uspto)**